

**Eine Neuentwicklung der trägerfreien
Ablenkungselektrophorese und ihre
Anwendung auf zytologische Probleme.**

Dr. K. Hannig

1964

AUS DEM
MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR EIWEISS- UND LEDERFORSCHUNG
MÜNCHEN

DIREKTOR: PROF. DR. W. GRASSMANN

**Eine Neuentwicklung der trägerfreien
Ablenkungselektrophorese und ihre
Anwendung auf zytologische Probleme.**

als Habilitationsschrift zur Erlangung der *venia legendi*
und Ernennung zum Privatdozenten in der Medizinischen
Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Dr. K. Hannig

1964

Habilitation vor der Medizinischen Fakultät, München: 16. 12. 1964

Erteilung der Lehrbefugnis für „Physiologische Chemie“: 21. 1. 1965



Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. W. Graßmann
verdanke ich die Anregung zur Entwicklung elektrophoretischer
Trennmethoden. Für die Förderung dieser Arbeit und für sein
stetes Wohlwollen möchte ich an dieser Stelle meinen
herzlichsten Dank aussprechen.

Herrn Prof. Dr. F. Miller (Pathologisches Institut der
Universität München), Herrn Prof. Dr. K. Kühn (Max-Planck-
Institut für Eiweiß- und Lederforschung, München) und
Herrn Dr. Th. Nemetschek (Anatomisches Institut der Uni-
versität Heidelberg) danke ich für anregende Diskussionen,
sowie für ihre Hilfe bei der Präparation und Herstellung
der elektronenmikroskopischen Aufnahmen, Frau Dipl. Chem.
G. Pascher, Herrn W. Klofat und Frl. C. Meyer für ihre wert-
volle Mitarbeit.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	1
1. Theoretische Grundlagen zur Elektrophorese in homogenen und heterogenen Systemen	7
2. Die klassischen und neueren diskontinuierlichen Elektrophoresemethoden	18
3. Die kontinuierliche Ablenkungselektrophorese	25
 I. Teil	
Die trägerfreie kontinuierliche Elektrophorese mit waagerechter Anordnung der Trennkammer	33
1. Beschreibung der Apparatur	34
2. Apparative und methodische Einzelheiten	41
3. Trennbeispiele	57
a) Trennung einer Farbstoffmischung	57
b) Auftrennung von Abbaupeptiden	58
c) Reinigung einer Elastaserohfraktion	59
d) Reinigung käuflicher Rohkollagenase	61
e) Auftrennung von Serumproteinen	61
f) Abtrennung von Pepsin aus Tropokollagenlösungen	65
g) Reinigung von einsträngigen DNS-Phagen des Bacterium coli (Escherichia)	66
 II. Teil	
Die vertikale Anordnung der trägerfreien Ablenkungselektrophorese und ihre Anwendung auf zytologische Probleme	69
1. Einleitung und Problemstellung	70
2. Apparatur mit vertikaler Anordnung der Trennkammer	74
3. Methodische Einzelheiten	82
4. Versuche zur Trennung von Zellen und Zellorganellen	86
a) Allgemeine Vorbemerkungen	86
b) Die Trennung der Zellfragmente aus grünem Spinat	90
c) Versuch zur Trennung von "Mitochondrien" und "Mikrosomen" aus Rattenleberhomogenat	94
d) Auftrennung einer Mischung von Human- und Kaninchenerythrozyten	98
e) Elektrophoretische Auftrennung einer Leukozytenanreicherung	98
f) Isolierung von Tumorzellen des Walker-Ascites-Tumors der Ratte	102

ist daher auch hier notwendig geworden, methodisch neue Wege zu erschließen und man könnte, zurückschauend auf die Entwicklung der letzten zwei Jahrzehnte, beinahe sagen, daß die Forschung dabei umso erfolgreicher war, je weiter sie sich von den Methoden der klassischen Chemie entfernt hat.

Die neuentwickelten Trennmethoden der biochemischen Forschung, die heute auch für viele andere Gebiete der Chemie Bedeutung erlangen, machen einerseits Gebrauch von Unterschieden der Verteilungsgleichgewichte der zu trennenden Stoffe, sei es zwischen Lösung und Oberflächen (Adsorptionschromatographie), sei es zwischen zwei flüssigen Phasen (Gegenstromverteilung; Verteilungschromatographie), andererseits von Unterschieden der Geschwindigkeit, mit der die einzelnen Stoffe unter der Einwirkung äußerer Kräfte wandern (Ultrazentrifuge; Elektrophorese). Dabei handelt es sich im Grunde fast stets um die Ausnutzung lange bekannter Eigenschaften, aber es ist kennzeichnend für die neuere Entwicklung, daß quantitative und oft geringfügige Unterschiede viel systematischer verwertet werden, als man dies früher versucht, oder auch nur für möglich gehalten hätte.

Die V e r t e i l u n g s m e t h o d e n sind im wesentlichen für die Trennung niedermolekularer Substanzen - wie Aminosäuren und Eiweißabbauprodukte - entwickelt worden. Die Methode der U l t r a z e n t r i f u g e auf der anderen Seite ist auf den Bereich der Proteine beschränkt; denn nur diese können mit den zur Zeit realisierbaren Schwerefeldern zur Sedimentation gebracht werden. Bei der E l e k t r o p h o r e s e dagegen wandert j e d e s elektrisch geladene Teilchen mit der ihm eigenen Geschwindigkeit; sie ist daher grundsätzlich ebenso auf hochmolekulare Stoffe, ja sogar auf grobdisperse Teilchen, wie auf niedermolekulare Substanzen anwendbar.

Bei der Elektrophorese wandern die Teilchen unter der Einwirkung einer definierten und experimentell variierbaren äußeren Kraft in einem reibenden Medium. Daraus resultiert, entsprechend etwa der Endgeschwindigkeit beim freien Fall im reibenden Medium, eine Wanderungsgeschwindigkeit, die für Teilchen gleicher Beschaffenheit bei Gleichheit des äußeren Feldes streng gleich ist und nicht statistisch um einen Mittelwert streut. Dieser Sachverhalt ist für die Schärfe elektrophoretischer Trennungen wesentlich.

Im allgemeinen unterscheidet man bei Wanderungsvorgängen im elektrischen Feld zwischen Katakinese und Ionophorese. Unter der ersteren versteht man die Wanderung kolloidaler Teilchen, bei denen die Ausbildung einer elektrischen Doppelschicht ein Grenzflächenpotential erzeugt, und unter Ionophorese die Wanderung elektrisch geladener niederer Partikelchen. In der neueren chemischen und physiologisch-chemischen Literatur hat es sich jedoch eingeführt, alle Verfahren der Analyse und der präparativen Trennung, bei denen Unterschiede der Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld ausgenutzt werden, als elektrophoretische Verfahren zu bezeichnen, gleichgültig, ob es sich um elektrisch geladene Teilchen kolloidaler Größenordnung oder um kleinere Ionen handelt. Tatsächlich ist es insbesondere im Gebiet der Eiweißkörper und ihrer hohen und niederen Abbauprodukte nicht möglich, scharf zwischen der Wanderung von Ionen und von elektrisch geladenen Kolloidteilchen zu unterscheiden. Die Eiweißkörper sind, wie man heute weiß, nicht undefinierte kolloidale Partikelchen, sondern sie liegen in ihren Lösungen als Makromoleküle, bzw. als Makroionen von definierter Größe und Gestalt vor, und ihre elektrische Aufladung ist auf eine in vielen Fällen genau bekannte Zahl anionisch oder kationisch geladener Gruppen zurückzuführen.

Mit der Verleihung des Nobel-Preises 1948 an A r n e T i s s e l i u s in Uppsala ist nicht nur der Begründer der neueren Elektrophoresetechnik geehrt, sondern auch die Wissenschaft erneut auf eine Forschungsrichtung hingewiesen worden, die sich ganz allgemein für biologische und medizi-

nische Untersuchungen als von hohem Wert erwiesen hat. Die *Elektrophorese* ist eine jener wenigen physikalisch-chemischen Methoden, die auch auf die empfindlichsten Stoffe anwendbar ist, weil es sich dabei nur um die Einwirkung elektrostatischer Kräfte auf die zur Wanderung veranlaßten Teilchen, bzw. Moleküle handelt.

Das elektrophoretische Verfahren nach *T i s e l l i u s* ¹⁾ hat sich für die Charakterisierung aller Proteine und Proteingemische als unentbehrlich und als eine hervorragende Ergänzung der Ultrazentrifugenmethode erwiesen. Besondere Bedeutung hat es z.B. für die klinisch wichtige Analyse der Serum- und Plasmaproteine, für die Virus- und Fermentforschung und zahlreiche andere eiweißchemische Fragen gewonnen. Dem steht allerdings nachteilig die Kompliziertheit der Apparatur und der hohe Preis, insbesondere des optischen Teiles der Apparatur entgegen, für viele Zwecke auch die etwas indirekte Art, in der die Ergebnisse gewonnen werden, und ihre geringe Eignung für präparative Trennungen.

Die elektrophoretische Analyse von Stoffgemischen läßt sich auch auf einem einfacheren Weg erreichen, der zwar grundsätzlich schon seit einigen Jahren bekannt war ²⁾, aber erst in den 50-er Jahren wieder aufgegriffen, (*T h. W i e l a n d*; *F. T u r b a u.* Mitarbeiter) ³⁾ und zu einer quantitativen und für die Praxis geeigneten Routinemethode ausgebaut (*W. G r a ß m a n n* u. *K. H a n n i g*) ⁴⁾ wurde. Die besondere Bedeutung dieser, als sogenannte "*P a p i e r e l e k t r o p h o r e s e*" eingeführten Arbeitsweise für das klinisch außerordentlich wichtige Gebiet der Serumanalyse ist allgemein bekannt. Es hat sich gezeigt, daß der Anteil der einzelnen Proteinfraktionen bei vielen Erkrankungen, z.B. der Leber, Milz, Niere, des Knochenmarks und des Lymphdrüsen systems, bei septischen und tuberkulösen Prozessen bedeutende und sehr charakteri-

stische Verschiebungen erfährt, deren Verfolgung dem Arzt prognostisch und diagnostisch wichtige Anhaltspunkte von ähnlicher Bedeutung, wie Blutbild, Senkungsgeschwindigkeit oder Elektrokardiogramm gibt. Auch die Papierelektrophorese ist im wesentlichen eine analytische Methode. Von präparativer Elektrophorese wird man nur dann sprechen können, wenn die getrennten Einzelkomponenten in Mengen gewonnen werden, die ihre Identifizierung mit chemischen Methoden oder die Durchführung weiterer chemischer Operationen an ihnen ermöglichen. Eine präparative Isolierung von Einzelkomponenten in der Papierelektrophorese kann dadurch erreicht werden, daß man die verwendeten Papierstreifen oder andere Trägermaterialien in ihrer Ausdehnung entsprechend groß wählt und dann die getrennten Fraktionen eluiert.

Ein prinzipiell anderer und leistungsfähigerer Weg für präparative Aufgabenstellungen ist von uns (W. G r a ß m a n n u. K. H a n n i g)⁵⁾ mit der als "k o n t i n u i e r l i c h e" oder "A b l e n k u n g s e l e k t r o p h o r e s e" bekannt gewordenen Arbeitsweise gefunden worden. Dieses kontinuierlich arbeitende Trennverfahren, das, obwohl eigentlich naheliegend, bis dahin noch nicht beschrieben oder angewandt war, hat sich in der Folge als sehr entwicklungsfähig erwiesen. Das Prinzip beruht darauf, daß man das zu trennende Gemisch in feinem Strahl in ein Medium einfließen läßt, das sich quer zu den Kraftlinien eines elektrischen Feldes bewegt. Elektrisch geladene Teilchen werden dann aus der Strömungsrichtung des Mediums um einen Winkel abgelenkt, der sich als Resultante aus der Strömungsgeschwindigkeit und der elektrophoretischen Beweglichkeit der Teilchen ergibt. (Vergl. dazu Abb. 3)

In den ersten apparativen Ausführungsformen erfolgte die Durchführung des neuen Trennprinzips innerhalb poröser

Träger, die die Pufferströmung stabilisieren (heterogene Elektrophorese). Die Apparaturen waren verhältnismäßig einfach gestaltet, da auf besondere Maßnahmen zur Vermeidung von Turbulenz und Konvektion durch Temperaturunterschiede oder Erschütterungen, wie sie bei der freien Elektrophorese erforderlich sind (Elektrophorese in homogenen Systemen; U-Rohr-Methode)¹⁾, verzichtet werden konnte. Allerdings mußten damit gewisse Einschränkungen des Anwendungsbereiches in Kauf genommen werden, die durch die chemischen und physikalischen Eigenschaften des Trägermaterials gegeben sind. Dazu gehören Adsorptions- oder Filtriereffekte, die bei Stoffen mit hoher Affinität zum Trägermaterial oder bei Materialien mit extrem hohen Teilchengrößen, wie Faserproteine, Viren, Bakterien, Zellen oder Zellorganellen eine Trennung erschweren oder überhaupt unmöglich machen. Wir haben deshalb nach Bedingungen gesucht, die elektrophoretische Trennungen nach dem Ablenkungsprinzip auch in freier Flüssigkeitsströmung gestatten, um somit den Anwendungsbereich der Methode auf die biologisch so wichtigen Materialien zu erweitern.

In vorliegender Arbeit werden zwei von mir entwickelte Anordnungen zur trägerfreien, kontinuierlichen Elektrophorese beschrieben und die damit neu erschlossenen Anwendungsmöglichkeiten an Hand einiger typischer Beispiele aufgezeigt.

Der I. Teil befaßt sich mit der Entwicklung und Anwendung einer technisch verhältnismäßig einfachen Apparatur mit w a a g e r e c h t e r Anordnung der Trennkammer, die erstmals in kontinuierlicher Arbeitsweise die Trennung von Faserproteinen und Phagen ermöglichte. Wegen ihrer außerordentlichen Trennschärfe ist sie als sehr leistungsfähige präparative Trennanordnung auch für niedermolekulare Stoffgemische, wie Farbstoffe, Aminosäuren, Peptide oder

Proteingemische und Enzyme der Träger-Anordnung deutlich überlegen.

Im II. Teil der Arbeit werden mit einer technisch weiter verfeinerten neu entwickelten Trennkammer erstmals gelungene Versuche zur Trennung von Zellen und Zellorganellen in der trägerfreien kontinuierlichen Elektrophorese beschrieben. Die zu überwindenden experimentellen Schwierigkeiten waren hierbei besonders groß. Wegen der unvermeidlichen Sedimentation der grobdispersen Teilchen im Pufferfilm mußte die Trennkammer, um Störungen zu vermeiden, vertikal gestellt werden. In dieser Lage sind, wie leicht einzusehen ist, ganz besondere Vorsichtsmaßnahmen zu treffen, um Konvektion innerhalb des strömenden Pufferfilms zu vermeiden.

Im Folgenden sollen zunächst einige theoretische Grundlagen der Elektrophorese erörtert und die wichtigsten bisher bekannten Anordnungen zu ihrer Durchführung beschrieben werden.

1. Theoretische Grundlagen zur Elektrophorese in homogenen und heterogenen Systemen.

Das Verhalten elektrisch geladener Teilchen, z.B. von Kolloiden oder Proteinen im elektrischen Feld, ist ähnlich dem von Ionen in einem Elektrolyten. In einer Lösung, welche eine Anzahl verschiedener elektrisch geladener Moleküle oder kolloidaler Komponenten enthält, wandern die einzelnen Typen der Partikel mit verschiedener elektropho-

retischer Geschwindigkeit. Die Wanderungsgeschwindigkeit eines bestimmten Stoffes hängt von der Größe seiner elektrischen Ladung und von seinem Reibungswiderstand in dem jeweiligen Medium ab; es ist dabei gleichgültig, ob die Ladung am Molekül selbst sitzt, oder ob sie durch Anlagerung von Fremdionen entsteht. Während die Ladungen einfacher Ionen, ihrer Wertigkeit entsprechend, immer der Ladung eines Elektrons oder eines Vielfachen davon gleich sind, also $4,8 \cdot 10^{-10}$ ESE (elektrostatische Einheiten) oder ein Mehrfaches davon betragen, ist die Ladungszahl bei Kolloiden, insbesondere bei Proteinen, Aminosäuren und anderen amphoteren Substanzen innerhalb meist weiter Grenzen variabel und vom pH-Wert des Milieus abhängig. H a r d y ⁶⁾, der 1899 die pH-Abhängigkeit der Wanderung von Proteinen bei Elektrophoreseversuchen beschrieb, führte den Begriff des i s o e l e k t r i s c h e n P u n k t e s ein, womit für eine gegebene Substanz der pH-Wert des isoelektrischen Verhaltens, also der Ladungssumme ± 0 gemeint ist, bei dem ein äußeres elektrisches Feld ohne Wirkung bleibt. Der isoelektrische Punkt hat also die Bedeutung einer charakteristischen, allerdings häufig vom Elektrolyt-Milieu abhängigen Konstante. Im Hinblick auf das Vorkommen gleicher isoelektrischer Punkte bei verschiedenen Stoffen kann man das elektrophoretische Verhalten zusätzlich durch die Angabe der Neigung der pH-Beweglichkeitskurve am isoelektrischen Punkt näher charakterisieren. Die Neigung der Kurve am isoelektrischen Punkt ist, wenn mit u die elektrophoretische Beweglichkeit bezeichnet wird, durch den Differentialquotienten

$$\frac{du}{dpH} \quad (1)$$

definiert.

Ein einheitliches elektrisches Feld der Feldstärke H erzeugt

an einem elektrisch geladenen Teilchen eine Kraft F ,

$$F = Q \cdot H \quad (2)$$

wobei Q die effektive Ladung des Teilchens ist.

Dieser Kraft wird durch die Reibungskraft gegenüber dem Medium das Gleichgewicht gehalten, so daß nach *Newton's* erstem Gesetz das Partikel mit einer konstanten Geschwindigkeit bewegt wird. Die Reibungskraft F' eines sphärischen Partikelchens vom Radius r wird durch das *Stokes'sche* Gesetz gegeben.

$$F' = 6\pi \cdot \eta \cdot v \cdot r \quad (3)$$

wobei v die Wanderungsgeschwindigkeit des Partikelchens und η der Viskositätskoeffizient des Mediums ist. Wenn sich beide Kräfte das Gleichgewicht halten, gilt also:

$$F = F'$$

Daraus ergibt sich nach *Debye* und *Hückel* ⁷⁾ die Wanderungsgeschwindigkeit v eines sphärischen Teilchens:

$$v = \frac{Q \cdot H}{6\pi \cdot \eta \cdot r} \quad (4)$$

Unter der Beweglichkeit u eines elektrophoretisch wandernden Teilchens versteht man den Quotienten:

$$u = \frac{v}{H} \quad (5)$$

Es muß bemerkt werden, daß sich die Gleichungen (3) und (4) nur auf das Verhalten eines Teilchens bei unendlicher Verdünnung und bei Abwesenheit von Salzen beziehen. Bei endlichen Verdünnungen wird die Beweglichkeit von Ladungsträgern (geladenen Molekülen von irgendwelcher Art) durch eine Anhäufung von Ionen entgegengesetzter Ladung nahe der Oberfläche des betrachteten Ladungsträgers gebremst. Enthält, wie es im praktischen Versuch immer der Fall ist, die Lö-

sung der betrachteten Teilchen auch noch Salze, so bildet sich infolge der Wechselwirkung elektrostatischer Kräfte um die z.B. negativ geladenen Teilchen eine Schicht positiver Ladungen aus, die beim Anlegen einer Spannung (unter fortwährender Erneuerung) entgegengesetzt zu den Teilchen wandern und damit deren Geschwindigkeit vermindern. Die Wirksamkeit einer solchen diffusen Doppelschicht (G. G o u y)¹⁰⁾ wird sowohl durch die Konzentration und Ladung der anwesenden Elektrolytionen als auch durch die Größe und Form der Teilchen bestimmt, ist aber unabhängig von der chemischen Natur der Elektrolyte (E. W i e d e m a n n)⁹⁾. Der Effekt der anwesenden Elektrolytionen wird nach L e w i s und R a n d a l l⁸⁾ durch eine additive Größe, die "I o n e n s t ä r k e" (μ) ausgedrückt:

$$\mu = \frac{1}{2} \cdot \sum c_i \cdot z_i^2 \quad (6)$$

Hierbei bedeutet c_i die Konzentration der i-ten Ionensorte und z_i deren Wertigkeit.

Die Abhängigkeit der Beweglichkeit u eines wandernden Teilchens von der Ionenstärke der Lösung kann bei nicht zu großer Änderung der Ionenstärke durch die Näherungsformel

$$u_1 : u_2 \approx \mu_2^{1/2} : \mu_1^{1/2} \quad (7)$$

angegeben werden (A. M a h l i g)¹¹⁾.

Zur quantitativen Berechnung der durch den "Salzeffekt" verursachten Verzögerung der Wanderungsgeschwindigkeit ist die Kenntnis des elektrokinetischen Potentials erforderlich, womit das maximale Potential entgegengesetzten Vorzeichens, das sich an der Oberfläche der das wandernde Teilchen umgebenden Lösungsmittelschicht ausbilden kann, bezeichnet wird. Die Größe dieses Potentials ist bei Abwesenheit von Salzen gleich dem Quotienten aus der Ladung Q

und der Dielektrizitätskonstante ϵ des Lösungsmittels mal dem Teilchenradius r

$$\zeta = \frac{Q}{\epsilon \cdot r} \quad (5)$$

Mit Zunahme des Salzgehaltes wird das elektrokinetische Potential kleiner.

Nach W i e d e m a n n ⁹⁾ ist die Vorstellung folgende:

Ein z.B. negativ geladenes, kugelförmig gedachtes Proteinteilchen, dessen Ladung $30 e^-$ betrage, führe an seiner Oberfläche eine dünne Lösungsmittelschicht mit sich, in die nur wenige positive Ladungen, z.B. $4 e^+$, eindringen können. Die resultierende Teilchenladung beträgt dann also $26 e^-$. Die zwischen einem solchen negativ geladenen Proteinteilchen und den vorhandenen elektrolytischen Ionen auftretenden elektrostatischen Kräfte bewirken nun eine Anhäufung positiver Ladungen (Ionen) um dieses Teilchen, deren Dichte mit dem Abstand von diesem exponentiell abnimmt. Das maximale, so entstehende positive Potential unmittelbar an der Oberfläche der das Teilchen umgebenden Lösungsmittelschicht wird als das elektrokinetische Potential bezeichnet. In der das Proteinteilchen umgebenden "Ionenwolke" befindet sich ein der resultierenden Teilchenladung Q ($26 e^-$) gleicher Betrag positiver Ladungen, deren Verteilung eine Funktion der Salzkonzentration ist. Denkt man sich diese positiven Ladungen ($26 e^+$) auf einer zum Proteinteilchen konzentrischen Schale gleicher Wirksamkeit zusammengefaßt, so folgt aus dieser Überlegung, daß diese Schale bei Abwesenheit von Elektrolyten unendlich weit vom Proteinteilchen entfernt sein muß, während sie mit zunehmender Ionenstärke immer mehr an das Proteinteilchen heranrückt. Den Abstand dieser hypothetischen Schale von der das Proteinteilchen umschließenden Lösungsmittelschicht nennt man die Dicke der elektrischen Doppelschicht. Diese hängt nur von der Ionenstärke ab und beträgt z.B. für $\mu = 0,005$ etwa $43 \text{ \AA}$, für $\mu = 0,02$ $21,5 \text{ \AA}$ und für $\mu = 0,5$ $4,3 \text{ \AA}$.

Aus den Gleichungen (4) und (5) ergibt sich für die Beweglichkeit u eines geladenen Teilchens in einer von anderen geladenen Teilchen freien Flüssigkeit unendlichen

Volumens

$$u = \frac{Q}{6\pi \cdot r \cdot \eta} \quad (9)$$

In Gegenwart anderer geladener Teilchen, z.B. von Elektrolytionen, ist die Beweglichkeit u vermindert, so daß die resultierende (effektive oder apparente) Beweglichkeit $\underline{u}$

$$\underline{u} = u - u' \quad (10)$$

beträgt. Der Term u' kann aus der Teilchenladung Q , dem elektrokinetischen Potential und der Dicke d der elektrischen Doppelschicht abgeleitet werden (A b r a m s o n, M o y e r und G o r i n)¹²⁾. Danach ergibt sich für $\underline{u}$:

$$u = \frac{Q \cdot d}{4\pi \cdot r^2 \cdot \eta} \quad (11)$$

Nach Gleichung (11) kann die effektive Beweglichkeit $\underline{u}$ eines Teilchens unter den üblichen Bedingungen der Elektrophorese berechnet werden, wenn seine Ladung bekannt ist.

Die praktisch wichtige Berechnung der apparanten elektrophoretischen Beweglichkeit $\underline{u}$ aus elektrophoretischen Versuchsdaten, also aus der Versuchszeit t , der Stromstärke I , der Leitfähigkeit κ der Untersuchungslösung, des in der Zeit t durchlaufenden Weges s und des Querschnittes q der Elektrophoresezelle, ergibt sich wie folgt: Da die Feldstärke H der Stromstärke direkt und dem Querschnitt der Zelle, bzw. Flüssigkeitssäule, sowie der Leitfähigkeit umgekehrt proportional ist, gilt

$$H = \frac{I}{q \cdot \kappa} \quad (12)$$

Bedeutet $\underline{u}$ die effektive Beweglichkeit der Teilchen unter der Wirkung der Feldstärke Eins (1 V/1 cm), so ist der von ihnen zurückgelegte Weg s in cm

$$s = \underline{u} \cdot H \cdot t = \frac{\underline{u} \cdot t}{q \cdot \kappa} \quad (13)$$

da $\underline{u} \cdot H = s/t$ ist, ergibt sich die Beweglichkeit $\underline{u}$ zu

$$\underline{u} = \frac{s \cdot q \cdot x}{I \cdot t}, \quad (14)$$

worin s den durchlaufenden Weg in cm, x die spezifische Leitfähigkeit in $\Omega^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, q den Querschnitt der Flüssigkeitssäule in cm^2 , I die Stromstärke in Amp. und t die Zeit in sec. bedeutet. Gleichung (14) ist für die Beweglichkeitsmessung allgemein gebräuchlich.

Die vorstehenden Betrachtungen wurden für die Elektrophorese in homogenen Medien angestellt. Bei Elektrophoreseversuchen in heterogenen Systemen müssen zusätzlich eine Reihe weiterer Faktoren berücksichtigt werden, die mit der Verwendung poröser Materialien in direkter Verbindung stehen.

Die theoretische Behandlung der elektrophoretischen Wanderung in Trägermaterialien als kapillarem System ist schwierig. In Gegenwart der Trägersubstanz wird nämlich weder der Verlauf der Feldlinien, noch der Wanderungsweg der wandernden Teilchen gerade, sondern immer gekrümmt sein, da die Poren des Materials die Teilchen zu mehr oder weniger großen Umwegen zwingen. K u n k e l und T i s e l i u s ¹³⁾ haben den Wanderungsweg durch Trägermaterialien, wie Filtrierpapier, in anschaulicher Weise als eine Art gewundener Tunnel gekennzeichnet. Dieser Sachverhalt bedeutet zunächst, daß die tatsächlich beobachtete Vorrückungsgeschwindigkeit einer Zone auch bei fehlender Adsorption geringer ist, als sie bei Versuchen mit gleichen Feldstärken in einem h o m o g e n e n Medium wäre. Er muß sich darüber hinaus auch auf die Trennschärfe auswirken, und zwar deshalb, weil die Umwege, welche die einzelnen Teilchen einzuschlagen haben, nicht in jedem Fall gleich sind, sondern einer statistischen Streuung unterliegen. Dieser Effekt, an dem natürlich

auch die Adsorption beteiligt ist, wird sich im Sinne einer Diffusionsverbreiterung der Zone auswirken, die sich der normalen Thermodiffusion überlagert. Im Gegensatz zu Thermodiffusion wird diese Art Diffusion, für welche die Bezeichnung *Diffusion zweiter Art* vorgeschlagen wurde¹⁴⁾, nicht von der Wanderungszeit, sondern im wesentlichen von der Länge der im heterogenen System durchwanderten Strecke und u.a. von den morphologischen und adsorptiven Eigenschaften der Trägersubstanz abhängig sein. Die Anwendung hoher Feldstärken und die dadurch bedingte Verkürzung der Trennzeiten wird die Thermodiffusion zu verkürzen erlauben, nicht aber die geschilderte Diffusion zweiter Art, die sich sogar bei raschem Durchschreiten des heterogenen Systems stärker auswirken kann als bei langsamer verlaufenden Wanderungen. Wir haben die Größe dieses Effektes in mehreren Versuchen geprüft¹⁴⁾ und in Übereinstimmung mit theoretischen Überlegungen gefunden, daß die Diffusion zweiter Art bei Aminosäuren und Peptiden gering, für Proteine viel beträchtlicher ist. Die durchweg ungünstigen Ergebnisse, die bei der Trennung von Proteinen mittels der *Hochspannungselektrophorese* bisher erhalten wurden, dürften diesem Umstand zuzuschreiben sein.

Adsorption

Die zur Stabilisierung der Zonen, insbesondere zur Vermeidung von Turbulenz und Konvektion verwendeten Trägersubstanzen sollen im Idealfall vollkommen indifferent sein, also weder zu den trennenden Substanzen, noch zu den anwesenden Ionen Affinität aufweisen. Dieser Idealfall ist aber fast niemals vollständig zu verwirklichen. Die Adsorption bedeutet, daß der jeweils adsorbierte Anteil der wanderungsfähigen Substanzen der Wanderung entzogen und dadurch die mittlere Wanderungsgeschwindigkeit der betreffenden Substanz entsprechend dem adsorbierten Bruchteil herab-

gesetzt wird. Auch aus diesem Grund werden die in heterogenen Systemen erhaltenen Wanderungsgeschwindigkeiten den in homogenen Medien ermittelten nicht entsprechen, ja nicht einmal parallel gehen.

Ob eine Verwischung der Zonen durch die Adsorption bewirkt wird, hängt von ihrer Reversibilität und von der Gestalt der Adsorptionsisotherme ab. Nur wenn die Adsorption in dem für die Trennung maßgeblichen Zeitraum vollkommen umkehrbar und wenn die Adsorptionsisotherme linear ist, wird man mit keiner nennenswerten Verbreiterung der Zonen durch Adsorption zu rechnen haben. Eine gekrümmte Adsorptionsisotherme, mit der man bei höherer Affinität zum Trägermaterial meist zu rechnen hat, führt bei der diskontinuierlichen Zonenelektrophorese dazu, daß auf der Rückfront der wandernden Zonen die letzten Anteile der adsorbierten Substanz nur sehr allmählich von der adsorbierenden Oberfläche losgelöst werden, wodurch das auch in der Chromatographie bekannte Nachziehen von Schwänzen (engl. tailing) zustande kommt. Der Trenneffekt kann dadurch erheblich eingeschränkt, mitunter illusorisch werden.

Eine der wesentlichen Vorteile der kontinuierlichen elektrophoretischen Arbeitsweise liegt in der unterschiedlichen Art und Weise, in der Adsorptionseffekte bei beiden Methoden in Erscheinung treten. Im Falle der kontinuierlichen Anordnung ist der adsorbierte Anteil sowohl der elektrophoretischen Wanderung wie dem Transport durch die strömende Flüssigkeit entzogen, und es werden daher sowohl die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit wie die Vorrückungsgeschwindigkeit in der Richtung der Elektrolytströmung um einen Bruchteil vermindert, der dem jeweils adsorbierten Anteil entspricht. Der mittlere Ablenkungswinkel der wandernden Teilchen bleibt also von der Adsorption unbeeinflusst. Die Adsorption äußert sich zunächst nur in der

verminderten Geschwindigkeit, mit der ein adsorbierbarer Stoff das Trennsystem durchwandert. Es kommt hinzu, daß innerhalb des schmalen Streifens, auf dem eine bestimmte Komponente vorrückt, bald eine Absättigung der Adsorptionszentren stattfindet, so daß im stationären Zustand das Ausmaß der Adsorption an sich stark vermindert ist. Bei sehr starker Adsorption werden allerdings erfahrungsgemäß auch bei dieser Methode die Zonen breiter. Es wird nämlich die Diffusion quer zur Wanderungsrichtung durch den Umstand begünstigt, daß die seitlich abdiffundierenden Teilchen, die auf noch unbeladenes Trägermaterial stoßen, einer Rückdiffusion mehr oder weniger stark entzogen werden und so das Gleichgewicht stören. Bei vollständiger adsorptiver Festhaltung auf der Trägersubstanz ist eine Trennung natürlich unmöglich. Das Problem der Adsorptionerscheinungen bei der diskontinuierlichen und kontinuierlichen Elektrophorese ist von W e b e r ¹⁵⁾ ausführlich mathematisch behandelt worden.

Zonenimperfektion

Von der oben besprochenen Art der Zonenverwaschung bei der diskontinuierlichen Zonelektrophorese, die auf der statistischen Streuung der mit dem Durchlaufen der Trägersubstanz verbundenen Verzögerung der elektrophoretischen Wanderung beruht, sind Effekte zu unterscheiden, für die sich die Bezeichnung Zonenimperfektion eingebürgert hat. Man versteht darunter grobere, örtliche Differenzen der Wanderungsbedingungen und damit der Wanderungsgeschwindigkeiten. Das Ergebnis bei der diskontinuierlichen Anordnung ist in fast allen Fällen, daß die Front einer Zone, die als gerader Strich aufgebracht wurde, nach einer gewissen Wanderung gekrümmt, geschlängelt oder schräg erscheint. Für die qualitative Erkennung der einzelnen Zonen sind solche Zonenimperfektionen, solange sie sich in mäßigen Grenzen halten, nicht von wesentlicher Bedeutung,

wohl aber wenn es sich um quantitative Bestimmungen oder präparative Aufarbeitung handelt.

Elektroosmose

Bei der Elektrophorese in heterogenen Medien weist auch die feste Phase, also das Trägermaterial, gegenüber der Pufferlösung eine eigene elektrische Aufladung auf, die durch das ζ -Potential gekennzeichnet ist. Da, anders als im Falle der Elektrophorese, die Teilchen der elektrisch aufgeladenen Trägersubstanz fixiert und die umgebende Flüssigkeit beweglich ist, wird bei Anlegung eines elektrischen Feldes die Flüssigkeit entsprechend ihrer Aufladung gegenüber der Trägersubstanz wandern.

Einflüsse von Erwärmung und Verdunstung

Mit dem Stromdurchgang ist notwendigerweise das Auftreten einer Jouleschen Wärme verbunden, deren Größe durch die Stromarbeit gegeben ist. Bei konstanter Feldstärke ist die Stromstärke und damit die pro Zeiteinheit auftretende Wärmemenge proportional dem Produkt aus Ionenladung, Ionenbeweglichkeit und Ionenkonzentration, summiert über sämtliche am Stromtransport beteiligten Ionen. In einem gegebenen Elektrolytssystem nimmt die Wanderungsgeschwindigkeit proportional der Feldstärke zu. Demnach steigen die Wattleistung und damit die pro Zeiteinheit auftretende Joulesche Wärme proportional dem Quadrat der Feldstärke an ($1 \text{ kWh} = 840 \text{ kcal}$). Sowohl bei Anwendung hoher Feldstärken wie beim Einsatz großer Substanzmengen zum Zweck präparativer Trennung ist daher eine Abführung der Jouleschen Wärme durch Kühlmaßnahmen unerlässlich. Dabei ist es meist nicht zu vermeiden, daß der vom Strom durchflossene Träger immer etwas wärmer sein wird als seine Umgebung und es wird demzufolge etwas Flüssigkeit vom Streifen verdampfen. Diese Flüssigkeitsmenge ergänzt sich durch Nachsaugen von Pufferlösung aus den beiden Elektrodenräumen. Dadurch resultiert eine Sog-

strömung (Verdunstungssog) von den beiden Elektrodenräumen her in Richtung auf die Streifenmitte, Aber auch andere, durch Druck- oder Niveauunterschiede in den Elektrolytgefäßen, oder durch verschieden starke Kapillarwirkung des Trägermaterials hervorgerufene Flüssigkeitsströmungen machen es notwendig, die sich gegenseitig überlagernden Strömungen bei Beweglichkeitsbestimmungen zu berücksichtigen. Dies kann in einfacher Weise geschehen, indem man ungeladene Substanzen dem Trenngemisch hinzufügt, die keine elektrophoretische Eigenwanderung zeigen, wie z.B. Dextran oder nichtionisierte Farbstoffe¹³⁾.

2. Die klassischen und neueren diskontinuierlichen Elektrophoresemethoden.

Wie aus den einleitenden Ausführungen hervorgeht, schließt die Elektrophorese als analytische oder präparative Trennmethode in ihrem Anwendungsbereich grundsätzlich alle Stoffe ein, die elektrische Ladungen tragen und dementsprechend im elektrischen Feld wandern. Voraussetzung zu ihrer Durchführung ist jedoch, daß geeignete experimentelle und apparative Bedingungen gefunden werden.

Die von T i s e l i u s¹⁾ entwickelten und inzwischen von anderen Autoren¹⁶⁾ verbesserten, teils vereinfachten Anordnungen¹⁷⁾ bauen im wesentlichen auf dem bekannten U-Rohrprinzip (vergl. Abb. 1) von N e r n s t¹⁸⁾ auf und dienen in erster Linie zur Messung von Wanderungsgeschwindigkeit und Konzentration der Komponenten, die u.a.

auf der Grundlage des T o e p l e r'schen Schlieren-
prinzips¹⁹⁾ sichtbar gemacht werden können.

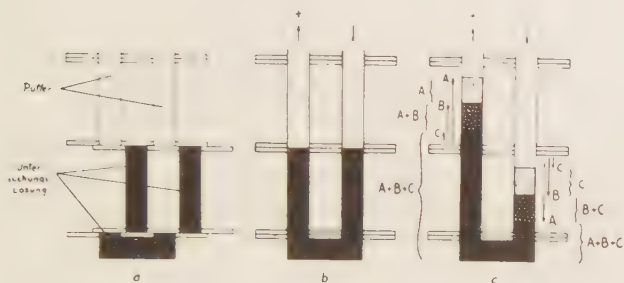


Abb. 1

Schematische Darstellung der gleichsinnigen elektrophoretischen Wanderung dreier Komponenten im U-Rohr (Methode der wandernden Grenzflächen).

a = Zellen gefüllt, geschlossen; b = Zellen geöffnet, Grenzflächen verschoben; c = Effekt des elektrischen Feldes nach einiger Zeit

Die schematische Zeichnung (Abb. 1) des eigentlichen U-Rohrs, die zugleich das Vorgehen beim Übersichten von Puffer- und Trennlösung erkennen läßt, zeigt das Wesentliche des Trennvorganges bei diesen Anordnungen. Nach Anlegen eines elektrischen Feldes wird die Grenzfläche zwischen der Pufferlösung und der zu untersuchen- den Substanz im Anodenschenkel nach oben vorrücken, im Kathodenschenkel sich um den gleichen Betrag zurückziehen, wobei, wegen der streng gleichen elektrophoretischen Beweglichkeit gleichartiger Ionen, bei Vermeidung von Konvektionsströmungen die Schärfe der Grenzfläche nahezu vollkommen erhalten bleibt und lediglich infolge Thermo- diffusion sehr langsam etwas herabgesetzt wird. Scharfe Grenzflächen können aber nur erhalten werden, wenn die Joulesche Wärme gleichmäßig und schnell abgeführt und die

Anordnung erschütterungsfrei angeordnet wird. Die Elektrophoresezelle, einschließlich der Elektrodenräume, wird zu diesem Zweck in einem thermostatisierten Wasserbad untergebracht und die Temperatur auf 4°C gehalten, entsprechend dem Dichtemaximum des Wassers.

Diese Verfahren verwerten zur Verfolgung der Trennung optische Methoden und setzen dabei eine lineare Beziehung zwischen Brechungsindex und Eiweißkonzentration voraus, was für Proteine in erster Annäherung zulässig ist. Da es sich jedoch um meist sehr kleine Unterschiede der Brechungsindices handelt, müssen sehr leistungsfähige optische Methoden angewendet und außerdem besondere Vorsichtsmaßnahmen zur Vermeidung von Konvektion und Turbulenz getroffen werden, was nur mit verhältnismäßig komplizierten Apparaturen erreicht wird. Da die optischen Verfahren schon bei teilweiser Trennung noch zu analytisch verwertbaren Ergebnissen führen, wird auf eine vollständige Trennung der Komponenten bei der U-Rohrmethode im allgemeinen verzichtet; sie ist jedoch durch zusätzliche Maßnahmen zu erreichen (Ausgleichsanordnung 20)), die allerdings zu einer weiteren Verkomplizierung der Arbeitsweise führen, namentlich dann, wenn es sich um präparative Herausarbeitung einer größeren Zahl von Komponenten eines Gemisches handelt.

Für alle Elektrophoreseanordnungen im U-Rohr ist charakteristisch, daß die zu trennende Lösung in beiden Schenkeln mit der spezifisch leichteren Pufferlösung überschichtet wird. Nur in der U-Rohranordnung ist es möglich, daß sowohl die Vorder- wie die Rückfront einer wandernden Zone sich unterhalb der spezifisch leichteren Pufferlösung befinden. Würde man in einem senkrecht stehenden geraden Rohr den Versuch machen, eine Schichtung herzustellen, bei der von unten nach oben Puffer, Trenn- und wieder Puffer aufeinanderfolgen, so würde sich diese Anordnung als nicht stabil erweisen.

Ein interessanter Versuch auch an trägerfreien Systemen eine Elektrophorese nach dem Prinzip der "wandernden Gren-

flächen" für präparative Zwecke in einer Säulenordnung durchzuführen, ist von S v e n s s o n ²¹⁾ in der sogenannten Dichtegradientenelektrophorese beschrieben worden. Das Trennrohr ist dabei mit einer Flüssigkeitssäule gefüllt, deren Dichte von unten nach oben abnimmt. Als Füllung kommen Wasser-Alkohol-Systeme oder Zuckerlösungen geeigneter Konzentration in Frage. Das zu trennende Substanzgemisch wird in den untersten Teil der Schicht eingebracht. Bisher sind lediglich Trennungen von Farbstoffen beschrieben, wobei relativ scharfe Zonen erhalten werden. Als präparative Methode ist auch diese Anordnung umständlich und nur für kleine Substanzmengen anwendbar.

In den durch Trägersubstanzen stabilisierten Anordnungen, wie sie im folgenden besprochen werden, existiert das Problem der Stabilität der Zonen praktisch nicht. Das Prinzip dieses als diskontinuierliche Zonenelektrophorese bekannt gewordenen Verfahrens ist folgendes: Das zu trennende Substanzgemisch wird an einer geeigneten, eng begrenzten Stelle in Form einer schmalen Zone auf einen mit Pufferlösung getränkten porösen Streifen, am einfachsten einen Filtrierpapierstreifen, aufgetragen. Nach Anlegen eines elektrischen Feldes an die beiden Schmalseiten dieses Streifens wandern die einzelnen Komponenten des zu untersuchenden Substanzgemisches entsprechend ihrer Ladung und elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit in verschiedene Richtungen unterschiedlich weit und können so vollständig voneinander getrennt werden. Ungefärbte Substanzen werden nach der elektrophoretischen Trennung durch geeignete Anfärbeverfahren sichtbar gemacht. Für die quantitative Auswertung der "Elektropherogramme" hat sich dabei die von uns (G r a ß m a n n u. H a n n i g)⁴⁾ entwickelte direkte Photometrierung der transparent gemachten Streifen fast allgemein durchgesetzt.

Die grundsätzlichen Unterschiede zwischen der klassischen freien Elektrophorese und der Zonenelektrophorese auf Streifen ergeben sich aus folgenden Überlegungen (vgl. Abb. 2a, 2b): Während sich bei der U-Rohrmethode in den beiden Schenkeln des U-Rohres ein stufenförmiges Konzentrationsgefälle der verschiedenen Fraktionen bildet, das für analytische Zwecke zur Bestimmung der Anzahl, Lage und Größe der Konzentrationsgradienten durch die optischen Methoden sichtbar gemacht werden kann, werden bei der Streifenelektrophorese die Komponenten vollständig getrennt, so daß sie nach der Anfärbung als einzelne Zonen sichtbar werden. Die Streifenelektrophorese oder Zonenelektrophorese kann man sich also als eine Elektrophorese in einem gestreckten U-Rohr vorstellen, wobei die einzelnen Zonen nach vollständiger Trennung durch das Trägermedium fixiert sind.

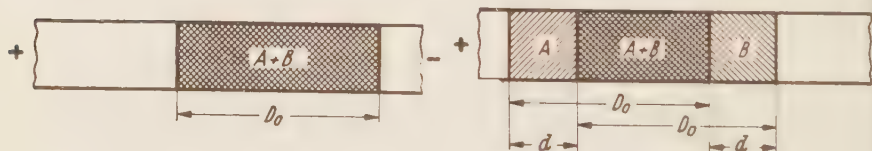


Abb. 2a Schema des Trennvorganges bei der U-Rohrmethode

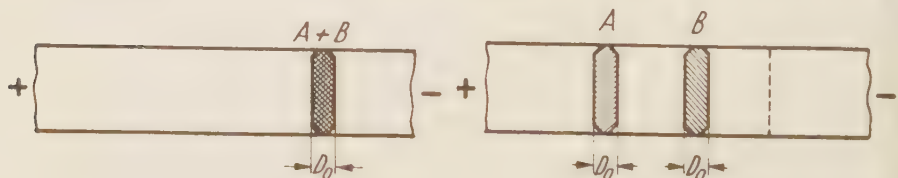


Abb. 2b Schema des Trennvorganges bei der Zonenelektrophorese

Der wesentliche Vorteil der Zonenelektrophorese in heterogenen Systemen ist, daß sich die Durchführung apparativ verhältnismäßig einfach gestaltet. Auf besondere Maßnahmen

zur Vermeidung von Turbulenz und Konvektion durch Temperaturunterschiede, Erschütterungen usw., wie sie bei der U-Rohrmethode erforderlich sind, kann verzichtet werden. Die auftretende Joule'sche Wärme muß lediglich so weit abgeführt werden, daß sich die Temperaturerhöhung in der durch Hitzebeständigkeit der untersuchten Substanzen gebotenen Grenze hält.

Seitdem die papierelektrophoretischen Analysen und Trennverfahren als eine neue, einfache und äußerst schonende Routinemethode für zahlreiche Aufgabenstellungen in der physiologischen und klinischen Chemie und darüber hinaus in vielen anderen Anwendungsgebieten der Chemie Eingang gefunden haben, hat es nicht an wissenschaftlichen Veröffentlichungen gefehlt, die sich mit der Technik des Verfahrens und der Beschreibung von Apparaturen zu dessen Durchführung befassen. Es ist nicht möglich und auch nicht die Aufgabe, im Rahmen dieser Darstellung auf alle Arbeiten einzugehen oder die vorgeschlagenen Anordnungen im einzelnen zu besprechen. Es seien nur einige Grundprinzipien von Anordnungen erwähnt, die sich in der Praxis bewährt haben:

Bei der Papierelektrophorese taucht der mit Pufferlösung getränkte Papierstreifen mit seinen beiden Enden in puffergefüllte Gefäße, die mit den beiden Elektroden in Verbindung stehen. Der Elektrophoresestreifen befindet sich dabei in einer mit Feuchtigkeit gesättigten Kammer, um Verdunstung soweit wie möglich zu vermeiden. Die zu untersuchende Lösung wird aufgetragen und nach einer gewissen Laufzeit werden die Streifen entnommen, getrocknet und nach Anfärbung mit geeigneten Reagentien photometrisch ausgewertet 4).

Wenn man die Dauer der elektrophoretischen Auftrennung abkürzen will, arbeitet man in der sogenannten "Hochspannungselektrophorese" mit erhöhten Feldstärken. In diesen Fällen kann man auch bei der Trägerelektrophorese wegen des erhöhten Stromdurchgangs auf geeignete Kühlmaßnahmen nicht mehr verzichten. Dazu werden zwei Wege beschritten; entweder man kühlt den Strei-

fen durch Einbetten in indifferente Lösungsmittel, (M i c h e l) 22) oder durch Auflage auf eine elektrisch isolierte Kühlplatte (W e r n e r und W e s t p h a l) 23). Besonders sorgfältig durchgebildet und ausführlich beschrieben sind entsprechende Anordnungen von S c h u l z e und B i e l 24), sowie von W i e l a n d und P f l e i d e r e r 25). Wegen der beschriebenen Adsorptionserscheinungen bleibt die Hochspannungselektrophorese auf verhältnismäßig niedermolekulare Substanzgemische beschränkt.

An Stelle von Filtrierpapier als Trägermaterial werden in neuerer Zeit auch Gele, z.B. aus Stärke (S m i t h i e s) 26), Agar (G r a b a r) 27) oder Cyanogum (R a y m o n d) 28) in Block- oder Säulen-anordnungen verwendet 29).

Die Zonenelektrophorese in ihren verschiedenen Ausführungsformen ist im wesentlichen als analytische oder kleinpräparative Trennmethode anzusehen. Bei den üblichen papierelektrophoretischen Anordnungen können z.B. etwa 0,5 bis 1 mg Protein pro Streifen aufgetragen werden. In der sogenannten Block- oder Säulenelektrophorese sind die Trennleistungen etwas höher (z.B. 20-50 mg Proteingemisch).

Eine entsprechende Vergrößerung der Anordnungen, wie es bei der Säulenchromatographie zur Trennung größerer Substanzmengen üblich ist, stößt bei der Elektrophorese auf erhebliche Schwierigkeiten. Die Abführung der notwendigerweise auftretenden J o u l e s c h e n W ä r m e bedingt nämlich beim Übergang zu größeren Dimensionen einen gesteigerten experimentellen Aufwand (vergl. z.B. P o r a t h) 30) und ist meist nur unvollständig möglich. Die abzuführende Wärmemenge wird bei Anwendung hoher Feldstärken, die für die Erzielung rascher Trennungen an sich erwünscht wäre, weiter beträchtlich erhöht; denn die Wattleistung und mit ihr die pro Zeiteinheit auftretende Wärme wächst bekanntlich unter sonst gleichen Bedingungen mit dem Quadrat der Feldstärke.

Auch wegen der diskontinuierlichen Arbeitsweise dieser Anordnungen und dem damit bedingten verhältnismäßig großen Zeitaufwand für das Ansetzen des Versuches (gegebenenfalls Neufüllung mit Trägermaterial) und der Elution der

Fractionen nach jeder Trennung, sind sie für präparative Arbeiten größeren Umfangs nur wenig geeignet oder zumindest sehr mühsam in der Anwendung, gegenüber der im folgenden Abschnitt zu besprechenden kontinuierlichen Elektrophoresemethode.

3. Die kontinuierliche Ablenkungselektrophorese

Bei dieser erstmals von G r a s m a n n und H a n n i g ⁵⁾ beschriebenen, sehr leistungsfähigen präparativen elektrophoretischen Trennmethode strömt eine Elektrolytlösung quer zu den Kraftlinien des elektrischen Feldes (vgl. Abb. 3). Das zu trennende Gemisch wird kontinuierlich an einer eng begrenzten Stelle dem strömenden Medium zugeführt, so daß Komponenten mit unterschiedlicher elektrophoretischer Beweglichkeit in verschiedener Richtung wandern und nach Verlassen der Anordnung an verschiedenen Stellen entnommen werden können. Da sowohl die Strömungsgeschwindigkeit wie die Feldstärke in weiten Grenzen experimentell variierbar sind, kann grundsätzlich jeder gewünschte Ablenkungswinkel eingestellt werden. Die Größe des Ablenkungswinkels, mit $\text{tg } \alpha$ bezeichnet, ergibt sich aus dem Verhältnis:

$$\text{tg } \alpha = \frac{\text{elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit (v)}}{\text{Strömungsgeschwindigkeit der Pufferlösung (w)}} \quad (15)$$

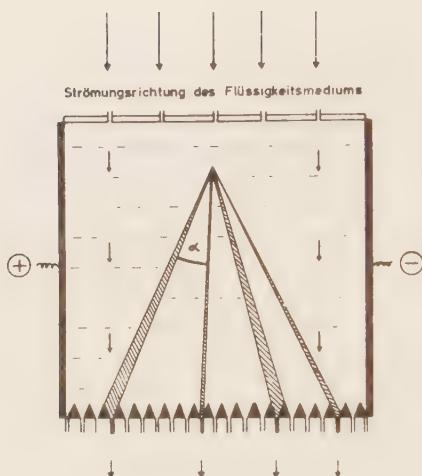


Abb. 2
Prinzip der Ablenkungselektrophorese

Nach den allgemein gültigen Gesetzen der elektrophoretischen Wanderung ist die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit v eines Stoffes proportional dem Strom i sowie der Beweglichkeit u und umgekehrt proportional dem effektiven Querschnitt der Elektrophoresekammer sowie der spez. Leitfähigkeit des Puffers.

$$v = \frac{u \cdot i}{q \cdot \chi} \quad (16)$$

Setzt man v in die Gleichung für $\operatorname{tg} \alpha$ ein, ergibt sich für den Ablenkwinkel:

$$\operatorname{tg} \alpha = \frac{u \cdot i}{q \cdot \chi \cdot w} \quad (17)$$

v = elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit in cm/sec; u = elektrophoretische Beweglichkeit des Teilchens in $\text{cm}^2/\text{V} \cdot \text{sec}$; i = Strom in Ampère; q = Querschnitt der Elektrophoresekammer in cm^2 ; χ = die spez. Leitfähigkeit in $\Omega^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; w = Strömungsgeschwindigkeit der Pufferlösung in cm/sec; $\operatorname{tg} \alpha$ = Ablenkwinkel.

Mit dieser einfachen Gleichung ist es also möglich,

bei Kenntnis der elektrophoretischen Beweglichkeit der zu trennenden Stoffe auch die geeigneten Versuchsbedingungen zu wählen und vorherzubestimmen, an welcher Stelle die Komponenten die Apparatur verlassen werden.

Das Schema in Abb. 3 macht es deutlich, daß zur Aufrechterhaltung eines stationären, völlig konstanten Betriebes Maßnahmen vorzusehen sind, die eine vollkommen laminare und gleichförmige Pufferströmung, sowie ein homogenes elektrisches Feld auch über lange Versuchszeiten gewährleisten. Es ist klar, daß diese strenge Forderung experimentell am leichtesten zu verwirklichen ist, wenn man die Flüssigkeitsströmung durch poröse Träger stabilisiert.

Es sind dazu im wesentlichen zwei Ausführungsformen geeignet: Bei der einen wird die Trennkammer durch eine sehr flache, mit Seesand, Glasperlen usw. gefüllte schmale Küvette gebildet, so wie sie von uns^{5a, b)} und kurze Zeit später von S v e n s s o n und B r a t t s t e n³¹⁾ in den ersten Mitteilungen beschrieben wurde; bei der anderen dient Filtrierpapier oder Filtrierkarton als Trägermaterial. Die "Küvetten"-Anordnungen bieten den Vorteil, daß die Transportgeschwindigkeit der Pufferlösung in weiten Grenzen variiert werden kann. Außerdem ist während des Trennvorganges sowohl eine Verdunstung als auch ein Zutritt von Luft unterbunden und die Kühlung zur Abführung der durch den Stromtransport gebildeten Jouleschen Wärme gelingt in einfacher Weise mit Kühlwasser. Trotzdem war die Aufrechterhaltung einer streng parallelen Flüssigkeitsströmung, die durch elektroosmotische Einflüsse gestört wird, ferner die Fernhaltung von Glasbläschen und störenden Polarisierungseffekten nicht einfach zu erreichen, so daß sich diese Apparaturen trotz guter Durchsatzleistungen in der Praxis nicht durchsetzen konnten.

Wesentlich einfacher konnte dagegen unser Trennprinzip in freihängendem Filtrierpapier (G r a ß m a n n u. H a n n i g ^{5b}); D u r r u m ³²) oder Filtrierkarton (H a n n i g ^{5c}); B r a t t s t e n ³³) als Trägermaterial verwirklicht werden. Die Strömungsgeschwindigkeit kann dabei im wesentlichen nur durch die Wahl der Filtrierpapiersorte und nur in relativ engen Grenzen variiert werden und eine Verdunstung mit entsprechenden Auswirkungen auf Pufferkonzentration und Strömungsverhältnisse ist nicht vollkommen vermeidbar. Bei einer Apparatur, die mit 3 mm starkem Filtrierkarton als Transportmedium arbeitete ^{5c}), konnten wir jedoch die Verdunstungsverluste durch die Kühlung des Kartons mittels eines Kaltluftstromes von der einen Seite her und gleichzeitigem Aufdampfen von Feuchtigkeit von der anderen Seite weitgehend vermeiden.

Die Trennleistungen bei Apparaturen mit Filtrierpapier liegen bei etwa 200-500 mg Substanzgemisch in 24 h, bei den Ausführungen mit Filtrierkarton konnten die Durchsatzleistungen auf etwa 5 bis 10 g pro Tag gesteigert werden.

Bei allen Anordnungen, die mit porösen Trägern arbeiten, müssen gewisse Einschränkungen des Anwendungsbereiches in Kauf genommen werden, die, wie schon erwähnt, durch die chemischen und physikalischen Eigenschaften des Trägermaterials gegeben sind. Dazu gehören vor allem Adsorptionseffekte, die schon bei niedermolekularen Stoffen mit hoher Affinität zum Trägermaterial eine Trennung erschweren oder unmöglich machen. Adsorptionseffekte oder Filtriereffekte sind bei sehr hochmolekularen Substanzen, wie z.B. bei Faserproteinen, Hämocyaninen, Viren usw. oder bei Materialien mit noch extremeren Teilchengrößen wie Zellen, Zellfragmenten oder Bakterien überhaupt nicht zu vermeiden, so daß die Ablenkungselektrophorese zur Fraktionierung dieser biologisch so wichtigen und interessanten Körper bisher nicht eingesetzt werden konnte.

Es war daher naheliegend, das kontinuierliche elektro-phoretische Trennverfahren auch ohne Verwendung eines Trägermaterials, also in homogener Lösung, durchzuführen, um den Anwendungsbereich dieser vielseitigen Methode zu erweitern. Die Voraussetzungen für eine vollkommen laminare Strömung sind jedoch hierbei viel schwieriger und nur mit verhältnismäßig großem experimentellem Aufwand zu verwirklichen. Auf besondere Maßnahmen zur Vermeidung von Turbulenz und Konvektion durch Temperaturunterschiede oder Erschütterungen kann im Gegensatz zur Trägerelektrophorese nicht mehr verzichtet werden.

Eine über Jahre sich hinziehende Entwicklung in unserem Institut führte schließlich nach Überwindung zahlreicher technischer Schwierigkeiten zu einer Apparatur, die erstmals das kontinuierliche Trennprinzip in einem vollkommen trägerfreien, h o m o g e n e n Milieu auch über lange Versuchszeiten ermöglichte (H a n n i g)³⁴⁾. (Vergl. dazu Teil I vorliegender Arbeit). Die Aufrechterhaltung stabiler Versuchsbedingungen und gleichförmiger Pufferströmung gelang nach folgendem Prinzip:

Zwischen zwei planen Glasplatten, die in einem Abstand von 0,5 mm angeordnet sind und somit eine schmale Elektrophoresekammer bilden, bewegt sich der Pufferfilm. Die Zuführung der Pufferlösung geschieht zwangsweise gleichmäßig durch eine Sechskanalschlauchpumpe in 6 verteilte Zutrittsöffnungen. Die Entnahme der Fraktionen und des Puffers am gegenüberliegenden Rand der Glasplatten geschieht ebenfalls zwangsweise und völlig gleichmäßig durch eine Entnahmevorrichtung, die im Prinzip eine Vielzahl kleiner kommunizierender Gefäße darstellt. Da jedes Gefäß mit dem daneben befindlichen über die Zuführung mit dem Trennraum in Verbindung steht, müssen sich bei waagerechter Lage alle Gläschen vollkommen gleichmäßig füllen. Dadurch bleibt zwangsläufig auch die Strömung in der Kammer gleichförmig. Nach Füllung der kleinen Gefäße kann der Inhalt durch eine

entsprechende Anzahl Röhrchen intermittierend entleert werden, z.B. durch kurzzeitiges Anlegen eines Vakuums an die geschlossene Reagensglaskammer.

In einer ähnlichen Anordnung, über die B a r r o l l i e u. Mitarbeiter³⁵⁾ berichteten, wurde nur teilweise auf die Verwendung von Trägermaterial verzichtet. An der Ein- und Austrittseite der Pufferlösung waren schmale Filtrierpapierstreifen von der Dicke des Pufferfilms zwischen die Glasplatten eingelegt. Auf der einen Seite wurde die Pufferlösung zugetropft, auf der anderen Seite wurden die Fraktionen an ausgeschnittenen Zipfeln dieses Streifens, die als Dochte wirken, entnommen. Abgesehen von den oben erwähnten Einschränkungen, die man in Kauf nehmen muß, wenn man auch nur teilweise poröse Trägermaterialien anwendet, werden mit einer derartigen Anordnung zusätzlich unkontrollierbare Störeffekte eingeführt, die eine kontinuierliche Arbeitsweise unmöglich machen.

So wird eine Gleichförmigkeit der Strömung des nicht stabilisierten Pufferfilms in der Trennregion als Folge ungleichmäßigen Abtropfens aus den Dochten niemals erreicht. Wie rasch die einzelnen Streifen saugen, hängt nämlich außer von ihrer Form, auch von manchen anderen nicht kontrollierbaren Faktoren ab, wie Verklebung oder Verstopfung durch Adsorption oder Veränderungen der Oberflächenspannung des Transportmediums durch eine getrennte Fraktion an einem oder mehreren Zipfeln. Das Abtropfen wird dadurch an einer bevorzugten Stelle erfolgen und damit wieder eine Vermischung an sich getrennter Fraktionen durch die Entnahmeverrichtung selbst hervorrufen. Aus diesem Grund wurde in der Zwischenzeit in der von Barrollier und Mitarb. beschriebenen Anordnung unser Prinzip zur Entnahme der Fraktionen übernommen (W i e k) 36).

Auch von anderen Autoren³⁷⁻³⁹⁾ wurden Versuche unternommen, in kontinuierlicher Arbeitsweise und in homogenem Medium elektrophoretische Trennungen durchzuführen. Entsprechende Anordnungen von D o b r y u. F i n n 37) sowie von B i e r 38) erlaubten zwar einen erheblichen Mengendurchsatz, waren aber nur auf

die Trennung einer anodisch einer kathodisch wandernden und einer neutralen Komponente beschränkt. Unterschiede der Beweglichkeiten innerhalb einer Wanderungsrichtung konnten nicht zur Trennung ausgenutzt werden. Eine von K o l i n 39) vorgeschlagene Lösung ermöglichte die Trennung von 3-4 Komponenten, wobei auch Beweglichkeitsunterschiede innerhalb einer Wanderungsrichtung für die Trennung genutzt werden konnten. Die Apparatur arbeitet mit einer Kombination elektromagnetischer und elektrischer Felder und dient vornehmlich analytischen Aufgaben.

In der von mir entwickelten trägerfreien Elektrophoreseapparatur konnte, wie gezeigt wird (Teil I), der Anwendungsbereich der Methode auf Linearproteine und auf Moleküle von extrem hohen Teilchengrößen, z.B. Phagen, mit einer bisher nicht erreichten Trennschärfe ausgedehnt werden.

Daß auch die Trennung von Zellen mittels der trägerfreien, kontinuierlichen Elektrophorese grundsätzlich möglich ist, konnte mit dieser Anordnung gezeigt werden. Die mehr oder weniger rasche Sedimentation dieser Teilchen in der zunächst horizontalen Anordnung der Trennkammer führt bei länger dauernden Versuchen jedoch zu einer Verklebung der unteren Glasplatte, die eine Fortführung der Versuche unmöglich machen. Erst in letzter Zeit ist es gelungen, auch diesen Mißstand durch Übergang zu einer vertikalen Anordnung der Trennkammer zu beseitigen. Die experimentellen Schwierigkeiten sind dabei deshalb besonders groß, weil bei dieser Lage des Pufferfilms kleinste Unregelmäßigkeiten des Kühlsystems innerhalb der Trennregion zu Konvektionsstörungen führen, die jegliche Trennung unmöglich machen. Die zu fordernde Genauigkeit des Kühlsystems konnte durch Anwendung des Prinzips der Peltier-Kühlung vollkommen überwunden werden, so daß diese Methode nunmehr völlig zuverlässig und absolut reproduzierbar arbeitet. (Vergl. Teil II).

Die neue Trenn- und Analysenmethode, die in vielen Fällen völlig neue Trennungen ermöglicht, in anderen Fällen die bisherigen Methoden (fraktionierte Zentrifugation und Dichtegradienten-Zentrifugation) durch ein völlig anderes Trennprinzip ergänzt, verspricht für die Zytologie, für immunbiologische und allgemein biochemische Probleme von größter Bedeutung zu werden.

I. T E I L

Die trägerfreie kontinuierliche
Elektrophorese mit waagerechter
Anordnung der Trennkammer.

1. Beschreibung der Apparatur

Die Abbildungen 4a-c zeigen zunächst den schematischen Aufbau der Trennkammer vereinfacht dargestellt.

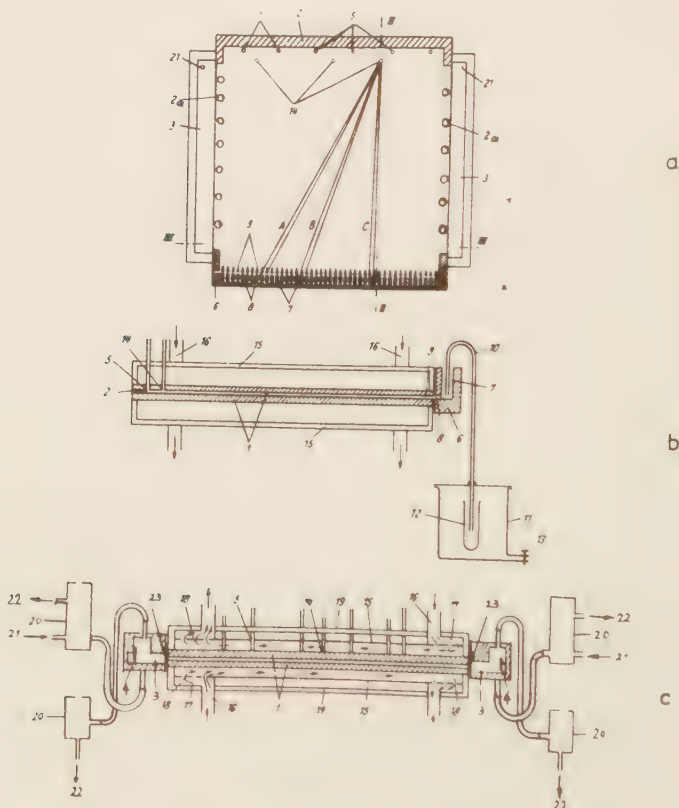


Abb. 4a-c. Schemazeichnung der Trennkammer.
a Ansicht von oben (vorn); b Schnitt II-II;
c Schnitt III-III. 1 Glasplatten (50 x 50 cm);
2 U-förmiger Plexiglasstreifen; 3 Elektrodenröhre;
4 Platinelektroden; 5 Bohrungen durch die obere Glas-
platte zur Pufferzuführung; 6 Entnahmevorrichtung;
7 Bohrungen (8 mm $\varnothing$; 30 mm tief); 8 Bohrungen senk-

recht zu 7 (3mm $\emptyset$); 9 Stege; 10 Absaugröhrchen; 11 geschlossener Behälter; 12 Auffanggläser (50 Stück); 13 Magnetventil; 14 Bohrungen durch die obere Glasplatte für die Zuführung der zu trennenden Substanzgemische; 15 Kühlmäntel; 16 Kühlluft-zuführung; 17 Kühlluftverteilerrohr; 18 Bohrungen durch 17; 19 Isolationsmantel; 20 Niveaugefäße; 21 Zu- und 22 Abführung der Elektrodenpülflüssigkeit; 23 Membranstreifen; A, B, C Wanderungswege dreier Komponenten

Sie besteht im wesentlichen aus zwei in einem Abstand von 0,5-0,6 mm parallel angeordneten Spiegelglasplatten (50 x 50 cm) (1), zwischen denen die Pufferlösung als gleichmäßiger Film strömt. Seitlich angebrachte Elektrodenräume (3) mit Platinelektroden (4), die ständig mit Pufferlösung umspült werden, geben über Membranstreifen den elektrischen Kontakt mit dem Pufferfilm.

Die Gleichförmigkeit der Strömung des Pufferfilms sowie die Aufrechterhaltung eines homogenen elektrischen Feldes innerhalb der Trennregion wird durch 3 Maßnahmen gewährleistet:

1. Die Zuführung der Pufferlösung erfolgt zwangsläufig und vollkommen gleichförmig durch 6 entsprechend verteilte Bohrungen (5) entlang des Randes der oberen Glasplatte mittels einer 6fachen Schlauchpumpe. Die Menge der Pufferzuführung und damit die Strömungsgeschwindigkeit innerhalb der Trennkammer ist dabei kontinuierlich in praktisch beliebigen Grenzen variierbar.
2. Die Entnahme der Fraktionen geschieht ohne Zwischenschalten von Dochten in freier Strömung ebenfalls zwangsweise völlig gleichmäßig durch eine Entnahmevorrichtung (6), die im Prinzip eine Vielzahl kleiner kommunizierender Gefäße darstellt. Sie besteht aus einer Leiste aus Kunststoff mit 50 Bohrungen (7) (8 mm $\emptyset$) und der gleichen Anzahl dazu senkrecht geführter Bohrungen (8) von 3 mm $\emptyset$. Mit den kleineren Bohrungen wird über eine Dichtung aus Gummi die Entnahmevorrichtung an die Plattenränder dicht aufgepreßt, so daß die zwischen den beiden Glasplatten strömende Elek-

trolytlösung in die kleineren Bohrungen eintreten und die Gefäße (7), gebildet aus den größeren Bohrungen, füllen kann. Zwischen den beiden Glasplatten an der Entnahmestelle sind zur genauen Einhaltung des Plattenabstandes kleine Stege (9) zwischen den Bohrungen angebracht. Da die kleinen Gefäße untereinander in kommunizierender Verbindung stehen, müssen sie (wenn die Entnahmeleiste genau horizontal liegt) zwangsläufig gleich hoch und mit gleichem Volumen entsprechend der Strömungsgeschwindigkeit der Pufferlösung gefüllt werden. Damit ist die Voraussetzung einer vollkommen gleichmäßigen Strömung innerhalb des Trennraums zwangsläufig gegeben. Um einen kontinuierlichen Betrieb aufrechtzuerhalten, müssen noch die kleinen Gefäße, wenn sie fast bis zum Rand gefüllt sind, rasch und gleichmäßig entleert werden können. Dies geschieht durch eine Absaugvorrichtung aus Kapillarröhrchen (10), die in ein geschlossenes Gefäß (11) münden, in dem sich 50 Auffanggläser (12) von geeignetem Volumen befinden, in deren Öffnungen die Enden der Entnehmeröhrchen (10) münden. Wenn die Auffanggefäße (9) in der Entnahmevorrichtung gefüllt sind, wird, gesteuert durch eine Zeitschaltuhr, über ein Magnetventil (13) kurzzeitig das Gefäß (11) evakuiert. Die kleinen Entnahmegefäße werden auf diese Weise schnell geleert. Schließlich wird Luft nachgesaugt und dadurch eine Heberwirkung der dünnen Kapillaren aufgehoben. Dieser Vorgang wiederholt sich beliebig oft.

3. Die Kühlung der Glasplatten erfolgt durch Beströmen der Glasplatten mit gekühlter Luft von -10 bis -35°C . Dadurch wird ein Durchbiegen der Platten weitgehend vermieden und ein homogenes elektrisches Feld aufrechterhalten. Die Kühlmäntel (15) aus Kunststoff sind auf die beiden Glasplatten gepreßt, die über die Luftzuführstutzen (16) durch ein Verteilungsrohr (17) mit Bohrungen (18) die Kühlluft gleichmäßig auf die Platten verteilen. Zur Isolation ist ein

weiterer Mantel (19) über dem eigentlichen Kühlmantel angebracht.

Das zu trennende Substanzgemisch wird durch eine der vorgesehenen Öffnungen (14) der Trennregion mittels einer Dosiervorrichtung zugeführt. Zur Vermeidung des unerwünschten Ein- und Ausströmens von Pufferlösung in die Trennregion aus den durchströmten Elektrodenräumen und umgekehrt (über die Membranstreifen (23)) müssen die Druckverhältnisse in den Elektrodenräumen denen in dem Trennraum angepaßt sein. Dies wird erreicht durch entsprechend angebrachte Niveaugefäße (20) an der Zu- und Abführung (21 u. 22) der Elektrodenaspülflüssigkeit. Durch geeignete Einstellung der Niveaugefäße kann man darüber hinaus eine Querströmung des Pufferfilms z.B. zur Kompensation elektroosmotischer Strömungen erreichen.

Den Pufferumlauf für die Elektrodenaspülung zeigt das Schema in Abb. 5. Mit Hilfe einer Zentrifugalpumpe (2) (am Deckel des Puffergefäßes (1)) wird über ein Verzweigungsstück (3) die Pufferlösung durch den Glaskühler (4) mittels Schlauchverbindungen den Niveaugefäßen (5 u. 6) und den Elektrodenräumen (7) zugeführt. Die ablaufende Pufferlösung passiert zunächst zur Sicherung der Anlage zwei Puffersicherungen (9), die nur bei ausreichendem Pufferfluß in Kontaktstellung sind. Bei ungenügender Pufferströmung schalten diese die Stromversorgung der gesamten Anlage ab (Sicherung gegen Funkenbildung und Überhitzung der Elektrodenräume). Die aus den Elektroden abströmende Pufferlösung gelangt schließlich wieder in das Vorratsgefäß, wo sie mit der übrigen Lösung vermischt wird.

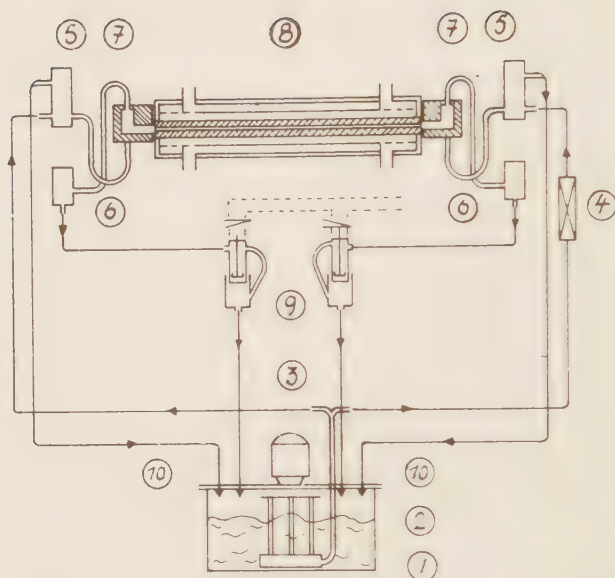


Abb. 5

Schema des Pufferumlaufs für die Elektrodenaspülung

1 = Puffervorratsgefäß; 2 = Tauchpumpe; 3 = Verzweigung; 4 = Kühler für Elektrodenpuffer; 5 = Niveaugefäße (Zulauf); 6 = Niveaugefäße (Ablauf); 7 = Elektrodenkammern; 8 = Trennkammer; 9 = Pufferlaufsicherungskontakte; 10 = Pufferrücklauf

Die Erzeugung der Kühleuft und die Kühleuftwege zeigt das Schema der Abb. 6.

Bei den beiden Kühlern (2) handelt es sich um sogenannte Flossenkühlkörper aus Kupferrohr mit Flossen aus einer Special-Leichtmetalllegierung. Der Drosselvorgang für das Kältemittel erfolgt durch ein Kapillarrohr. Die beiden Kühler sind kältemäßig hintereinander geschaltet, im Gegenstrom zur Luftströmung. Zur Kühlung der beiden Kühlkörper ist ein vollhermetisches Kälteaggregat, 3/4 PS, 380 Volt Drehstrom, 50 Hz, eingebaut, welches eine Kälteleistung von ca. 1300 Cal/h bei -10°C Verdampfungstemperatur besitzt

und mit F 22 als Kältemittel gefüllt ist. In dem Luftweg der Kühlluftableitung von der Trennkammer ist ein Fernthermometer mit Thermostat (7) eingebaut, der automatisch die gewünschte Kühllufttemperatur reguliert und konstant hält. An gleicher Stelle ist ein Sicherheitsrelais (6) (Thermoregler) angebracht, welches bei zu hoher Ablufttemperatur (über 20°C) die gesamte Anlage aus Sicherheitsgründen abschaltet.

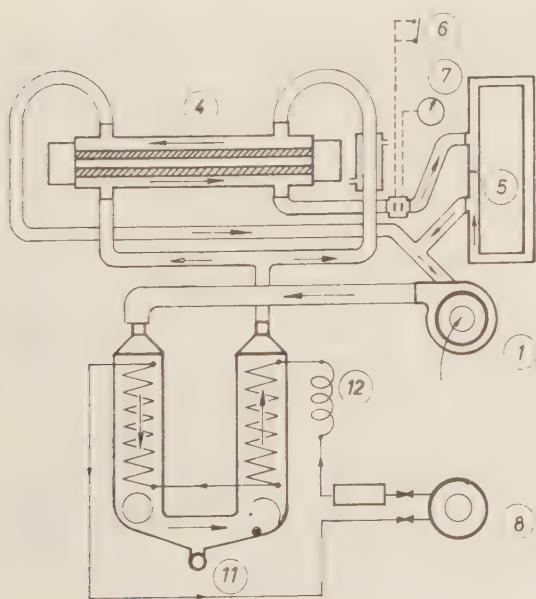


Abb. 6

Luftkühler und Schema des Luftkühlkreislaufes

1 = Exhaustor; 2 = Kühler I und Kühler II; 3 = Glaskühler zur Kühlung des Elektrodenpuffers; 4 = Trennkammer; 5 = doppelwandige Reagenzglaskammer; 6 = Sicherheits-Thermoregler; 7 = Abluftfernthermometer mit Thermostat; 8 = Kühlaggregat; 9 = Trockner; 10 = Kapillarrohr-Einspritzung; 11 = Tauwasserablauf

In einer zweckmäßigen Anordnung sind Trennkammer, Luftkühlaggregat, Gleichrichter und Schaltpult sowie die nötigen Zubehörteile, wie Puffervorratsgefäße und Pumpvorrichtungen, zu einem geschlossenen Ganzen vereint. Abb. 7 zeigt die Gesamtansicht der Trennapparatur.

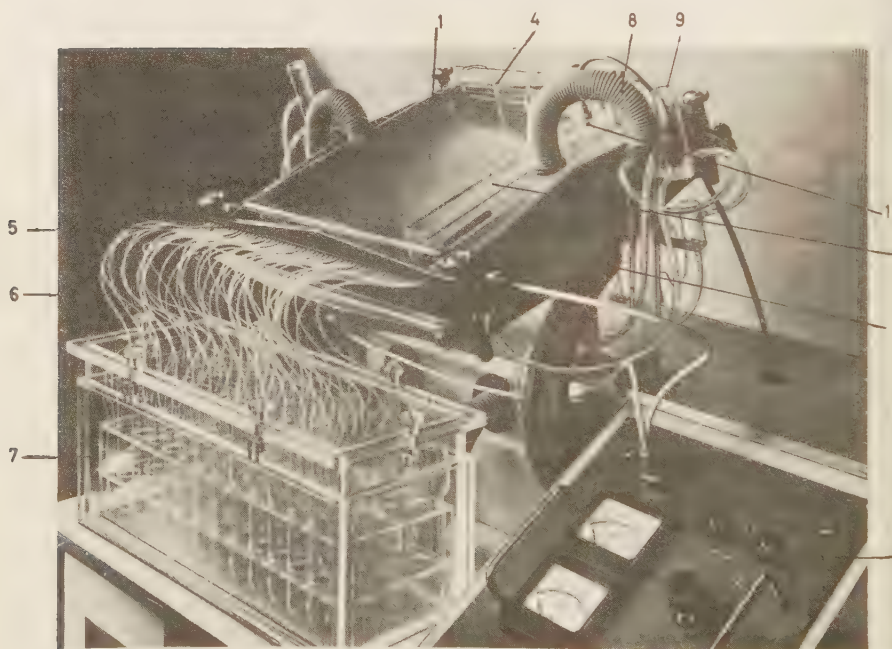


Abb. 7

Gesamtansicht der Trennapparatur

1 = Trennkammer; 2 = Haltevorrichtung; 3 = Bedienungspult; 4 = Pufferzuführung; 5 = Entnahmevorrichtung; 6 = Absaugröhrchen; 7 = Doppelwandige Reagenzglasvakuumkammer; 8 = Kühlluftzuführung und Pufferkühlung; 9 = Niveaugefäße; 10 = Kühlkammer zur Aufnahme des Substanzbehälters; 11 = Dosierpumpe für die Zuführung des zu trennenden Substanzgemisches (Mikroschlauchpumpe)

2. Apparative und methodische Einzelheiten

a) Konstanz der Leitfähigkeit und des pH-Wertes

Eine Veränderung der Elektrolytzusammensetzung während des Versuches in der kontinuierlichen trägerfreien Elektrophoreseanordnung kann in erster Linie durch Elektrolyseprodukte von den Elektroden her herbeigeführt werden. Wir haben uns davon überzeugt, daß bei der beschriebenen Anordnung keine Einwirkungen durch Elektrolyseprodukte auf die Elektrolytzusammensetzung im Inneren der Kammer nachweisbar ist, wenn die sich an die Trennkammer anschließenden Elektrodenkammern mit den Platinelektroden intensiv mit Pufferlösung durchspült werden. Es hat sich dabei als zweckmäßig erwiesen, die Ionenstärke der Pufferlösung zur Durchspülung der Elektroden etwa um den dreifachen Wert höher zu wählen als diejenige des durch die Trennkammer bewegten Pufferfilms. Dadurch bleiben nämlich Elektrolytkonzentration und pH-Wert des zur Spülung der Elektroden dienenden Puffers auch über längere Versuchszeiten konstant. Die Spülung der Elektroden erfolgt im Kreislauf, so daß die durch den Anoden- und Kathodenraum getrennt strömende Pufferlösung wieder in ein gemeinsames Vorratsgefäß zusammengeführt wird und dann erneut mittels einer Pumpvorrichtung durch die beiden Elektrodenräume geleitet wird. Veränderungen der Konzentration und des pH-Wertes können also nur eintreten, wenn flüchtige gasförmige Elektrolyseprodukte entweichen. Wenn sich der pH-Wert der Elektrodenspülflüssigkeit um mehr als 0,5 pH-Einheiten verändert, ist aber auf jeden Fall ein Wechsel der Pufferlösung empfehlenswert. Eine öftere Erneuerung empfiehlt sich auch dann, wenn man einzelne Fraktionen, auf die kein Wert gelegt wird, durch starke Ablenkung in die Elektrodenräume abwandern läßt

(beispielsweise bei der elektrophoretischen Entsalzung von Stoffgemischen). Als geeignete und zweckmäßige Ionenstärke der Pufferlösung innerhalb der Trennkammer hat sich ein Wert von $\mu = 0,03$ bis $0,05$ erwiesen. Die spezifische Leitfähigkeit soll in den Grenzen von $0,001$ bis $0,0025 \Omega^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ gehalten werden.

Die Abrenzung des Trennraumes von den Elektrodenräumen kann bei der trägerfreien Anordnung durch Membranstreifen erfolgen, die ein Einströmen von Elektrodenpuffer in den Trennraum und umgekehrt verhindern. Bei Verwendung neutraler Membranstreifen, (z.B. Membranen aus Acetylcellulose) muß an der Übergangsstelle innerhalb der Membrane wegen des hohen Widerstandes dieses Materials mit einem verhältnismäßig hohen Spannungsabfall gerechnet werden. Bei hohen Feldstärken kann dabei durch Überspannungen an den Membranoberflächen ein Flattern und sogar Gasbildung bei starker örtlicher Überhitzung auftreten. Um diesen Effekt zu vermeiden, ist es zweckmäßig, nicht nur den Elektrodenpuffer, sondern auch den Puffer an beiden Seiten innerhalb der Trennkammer konzentrierter zu verwenden. Durch diese Maßnahme herrscht infolge der größeren Leitfähigkeit in der Nähe der Membranen ein geringeres elektrisches Feld, so daß die erwähnten Erscheinungen ausbleiben. Dies hat gleichzeitig den Vorteil, daß elektrophoretisch schnell wandernde Substanzen, die man noch isolieren will, nicht vor Erreichen der Entnahmevorrichtung in die Elektrodenräume abwandern. Die Wanderungsgeschwindigkeit in den höher konzentrierten Randzonen ist wegen der geringeren Ionenbeweglichkeit (vgl. Gleichung (7)) und wegen der geringeren Feldstärke in diesem Bereich bedeutend kleiner als in der Mitte der Trennkammer. Dadurch werden diese Fraktionen weniger weit abgelenkt und können noch aufgefangen werden.

In letzter Zeit haben sich jedoch für die Abgrenzung des

Elektrodenraumes vom Trennraum Ionenaustauschermembranen besonders bewährt. Der Widerstand dieser Membranen ist sehr gering (10-50 mal geringer als bei Verwendung neutraler Membranen), so daß beim Übergang von dem größeren Querschnitt der Elektrodenkammern in den kleineren Querschnitt der Trennkammer nur ein geringer Spannungsabfall eintritt. Zu diesem Zweck werden Anionenaustauschermembranen an die Kathodenseite und Kationenaustauschermembranen an der Anodenseite angebracht. Die Pufferkonzentration innerhalb des Trennraumes kann dadurch über die ganze Ausdehnung konstant gehalten werden. Ein Abwandern von schnell wandernden Anionen oder schnell wandernden Kationen in die Elektrodenräume wird dabei gleichfalls durch die Austauschwirkung an den Membranoberflächen, die als Schranke wirken, vermieden. Umgekehrt können Anionen, bzw. Kationen aus den Elektrodenräumen in den Trennraum ungehindert einwandern. Dagegen werden ebenso wie die schnell wandernden Fraktionen die Elektrolytionen an der Anodenseite der Trennkammer gesperrt und umgekehrt. Dadurch resultiert an den Rändern der Trennkammer eine Anreicherung von Anionen bzw. Kationen, die an den Rändern der Trennkammer eine leichte pH-Verschiebung und eine Erhöhung der Elektrolytkonzentration verursachen. Der Bereich der veränderten Elektrolytkonzentration und des pH-Wertes ist jedoch sehr schmal, er bewegt sich zwischen zwei und drei Zentimetern. (Abb. 8)

In Abb. 8 sind Leitfähigkeit und pH-Wert für einen der gebräuchlichsten Puffer in den einzelnen Aufanggläsern nach der elektrophoretischen Trennung wiedergegeben. Dazu wurde ohne Zuführung eines Trenngemisches bei angelegter Spannung lediglich der Pufferfilm durch die Trennkammer bewegt. Wie die Abbildung zeigt, ist über eine Trennbreite von etwa 40 cm sowohl der pH-Wert als auch die Elektrolytkonzentration sehr konstant geblieben. Lediglich die ersten drei, bzw. die letzten drei Fraktionen zeigen eine Veränderung.

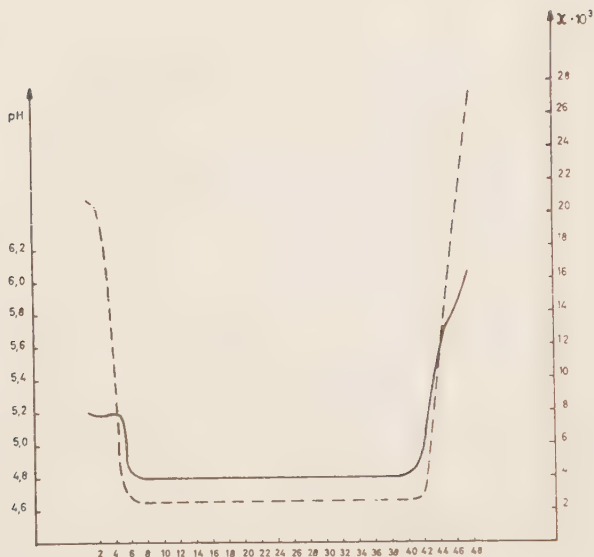


Abb. 8

Leitfähigkeit und pH-Wert in den Auffanggläsern
nach einem elektrophoretischen Trennversuch:

Eingesetzter Puffer: Acetatpuffer pH 4,8; spez. Leitfähigkeit: $0,0016 \Omega^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; Spannung: 2500 Volt; Stromstärke: 160 mA.

— pH-Kurve
- - - Leitfähigkeitskurve

Interessant ist die Überlegung, daß es für besondere Trennprobleme günstig sein kann, innerhalb des Trennraumes einen Konzentrations- bzw. pH-Gradienten zu legen. Ein Beispiel soll dies erläutern:

Ein 3-Komponentengemisch soll aufgetrennt werden. Die eine Komponente (A) hat eine sehr rasche und unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit gegenüber zwei ähnlich verhaltenden Komponenten (B,C). Unter normalen Bedingungen, also ohne Verwendung eines Puffergradienten, müßte man ein solches Gemisch in zwei Läufen trennen. Und zwar zunächst unter Bedingungen, bei denen die schnell wandernde Fraktion (A) eben noch in der Auffangvorrichtung ankommt. Die beiden in Bezug auf ihre elektrophoretische Beweglichkeit nur wenig unterschiedlichen Fraktionen (B,C) würden sich dagegen unter diesen Bedingungen noch nicht trennen. In einem zweiten Lauf könnten dann diese beiden sich wenig

unterscheidenden Fraktionen unter extremeren Bedingungen aufgetrennt werden.

Erzeugt man jedoch in der Trennkammer z.B. einen pH-Gradienten in der Weise, daß man die rasch wandernde Fraktion in ihrem isoelektrischen Bereich hereinlaufen läßt, so kann man bereits im ersten Trennversuch mit optimalen Bedingungen, also hohen Feldstärken arbeiten, um die beiden wenig unterschiedlichen Komponenten noch zu trennen. Die rasch wandernde Komponente läuft dann, wenn sie im isoelektrischen Bereich angekommen ist, senkrecht nach unten (vergl. dazu Abb. 9).

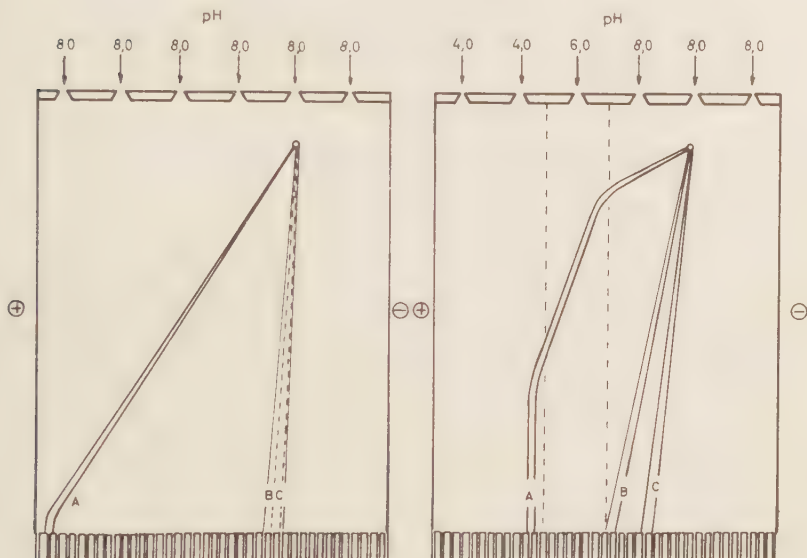


Abb. 9

Darstellung der Wanderungswege von drei Komponenten A, B u. C mit und ohne pH-Gradient im Trennraum

a) ohne pH-Gradient (500 Volt Klemmenspannung)
 b) mit pH-Gradient (2000 Volt Klemmenspannung)
 A = schnell wandernde Fraktion; B u. C = langsamer wandernde und in Bezug auf ihre elektrophoretische Beweglichkeit sich nur wenig unterscheidende Komponenten

b) Konstanz des elektrischen Feldes und der Pufferfilmtemperatur

Für den geradlinigen Verlauf der getrennten Fraktionen durch die Trennregion ist ein homogenes und gleichmäßiges elektrisches Feld Voraussetzung. Durch Anbringen kleiner Öffnungen in die obere Glasplatte wurden Platinkontakte eingeführt und Feldstärkemessungen innerhalb der Trennregion vorgenommen. Der durch diese Messungen erhaltene Verlauf der Äquipotential- und Feldlinien ist in Abb. 10 dargestellt. Man sieht daraus, daß praktisch im ganzen Trennraum ein sehr homogenes elektrisches Feld herrscht.

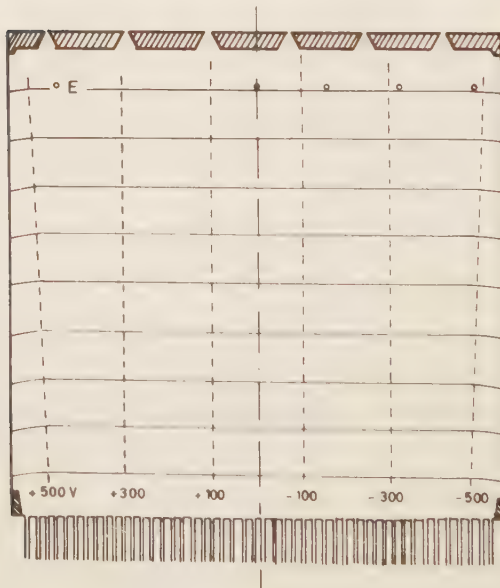


Abb. 10

Verlauf der Äquipotential- u. Feldlinien innerhalb der Trennkanäle

— elektr. Feldlinien
 --- Äquipotentiallinien
 von 200 zu 200 V

Für die überschlagsmäßige Berechnung der günstigsten Bedingungen zur Wärmeabführung des Pufferfilms (Joulesche Wärme) können die allgemein gültigen Gleichungen der

Kältetechnik angewendet werden⁴⁰⁾. Im vorliegenden Fall, also für die Abführung der Jouleschen Wärme durch einen Kaltluftstrom über eine Glasplatte, gilt folgende Gleichung:

$$Q = \frac{F (t_1 - t_2)}{\frac{1}{\alpha_1} + \frac{\delta}{\lambda} + \frac{1}{\alpha_2}} \quad (18)$$

Q = abgeführte Wärmemenge (Kcal/Std.); F = Oberfläche der beiden Glasplatten (m^2); t_1 = mittlere Temperatur des Pufferfilms ($^{\circ}C$); t_2 = mittlere Temperatur der Kühlluft ($^{\circ}C$); α_1 = Wärmeübergangszahl für ruhendes Wasser (Kcal/ $m^2 \cdot h \cdot ^{\circ}C$); α_2 = Wärmeübergangszahl bei turbulenter Luftströmung (Kcal/ $m^2 \cdot h \cdot ^{\circ}C$); δ = Dicke der Glasplatten (m); λ = Wärmeleitfähigkeit des Glases (Kcal/ $m^2 \cdot h \cdot ^{\circ}C$)

Setzt man in diese Gleichung die für die beschriebene Trennkammer gegebenen Daten ein, also $F = 0,5 m^2$, für $\alpha_1 = 500$ (Wert für Wasser), für $\delta = 0,006 m$, für $\lambda = 0,65$ (Wert für das verwendete Glas), für $\alpha_2 = 29$ (Wert für Luft bei einer Strömungsgeschwindigkeit von 7 m/sec), erhält man für die Temperaturdifferenz zwischen Kühlluft und Pufferfilm:

$$t_1 - t_2 = \frac{Q}{11} \quad (19)$$

Aus der Berechnung, die übrigens mit den tatsächlich gefundenen und gemessenen Werten übereinstimmt, ergibt sich, daß bei einer angelegten Last von 450 W, entsprechend 360 Kcal/Std., an die Trennkammer, die Kühltemperatur etwa $-20^{\circ}C$ betragen muß, um den Pufferfilm auf $+20^{\circ}C$ zu halten. Das sind etwa auch die maximalen Leistungen, die mit dieser Apparatur erzielt werden können.

Bei einer Belastung von 150-200 W oder 130-170 Kcal/Std. kann die Pufferfilmtemperatur in der Nähe des Gefrier-

punktes gehalten werden, was für die Trennung empfindlicher Substanzgemische oft wünschenswert ist.

Aus der Gleichung kann aber auch entnommen werden, welche Maßnahmen getroffen werden können, um die Kühlwirkung auf den Pufferfilm zu verbessern. Wird die Dicke des Glases um die Hälfte verringert, ändert sich nicht viel. Unter Bedingungen des oben angeführten Beispiels würde dann die Puffertemperatur lediglich um etwa 4°C erniedrigt werden. Das gleiche gilt, wenn man statt normalen Glases Quarzglas mit doppelter Wärmeleitzahl verwendet. Wenn dagegen die Luftgeschwindigkeit erhöht wird, z.B. auf das Doppelte, ändert sich der α_2 -Wert auf 51 (statt 29). Man würde damit sofort erreichen, daß die Temperatur des Pufferfilms um $13-14^{\circ}\text{C}$ niedriger wird. Es ist jedoch zu bedenken, daß durch eine zu starke Erhöhung der Geschwindigkeit des Luftstroms so starke Reibungskräfte auftreten können, daß diese zusätzlich eine Erwärmung verursachen können. Die optimalen Bedingungen sind daher meist nur empirisch zu erreichen, was mit den Verhältnissen, die wir in unserer Apparatur antreffen, wenigstens annähernd geschehen ist.

Die Temperaturkonstanz innerhalb des Trennraumes haben wir ähnlich ermittelt, wie die Messung der Feldlinien. Dazu wurden durch die Oberseite der Glasplatte, in verteilte Bohrungen kleine Widerstandsthermometer eingesetzt und über ein Leitfähigkeitsmeßgerät die Temperatur an einzelnen Stellen gemessen. Die erhaltenen Ergebnisse des Temperaturverlaufes innerhalb der Trennkammer sind in Abb. 11 wiedergegeben. Danach wird es deutlich, daß in der Mitte der Trennkammer ein geringer Temperaturanstieg bei der Luftkühlung nicht zu vermeiden war. Er hielt sich jedoch in solchen Grenzen, daß Thermokonvektion bei der waagerechten Anordnung vermieden werden konnte. Bei höheren Belastungen der Trennkammer sind die Unterschiede naturgemäß höher, bei niedrigerer Belastung entsprechend kleiner.

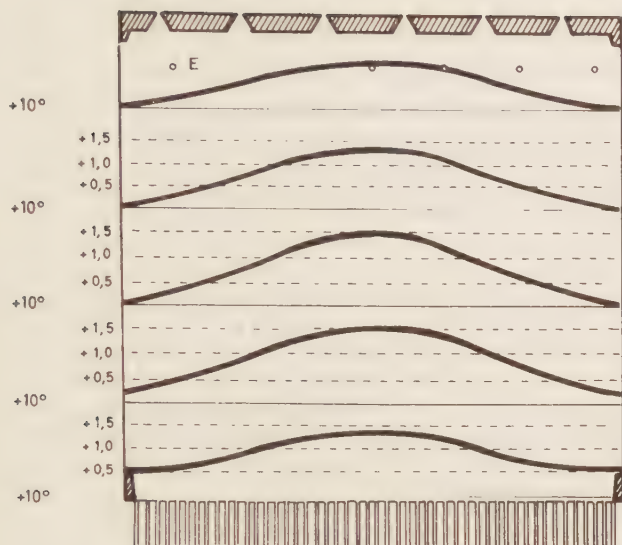


Abb. 11

Temperaturverlauf innerhalb des Pufferfilms
während eines Trennversuches

Trispuffer, pH 6,9; 2 000 Volt; 160mA; (320 Watt)

c) Die Gleichförmigkeit der
Pufferströmung

Die Konstanz und Gleichförmigkeit der Pufferfilmströmung innerhalb der Trennregion kann durch Strömungsversuche mit Farbstoffen kontrolliert werden. Läßt man gleichzeitig an verschiedenen Eintrittsöffnungen, also in der Mitte und an den Rändern der Kammer eine Farbstofflösung gleichzeitig in den strömenden Puffer einströmen, so müssen zunächst die Fronten nach gleicher Zeit an der Austrittsseite ankommen und die einzelnen Farbstoffzonen müssen parallel zueinander laufen. Dies ist bei einer richtig zusammengesetzten Kammer und bei vollkommener

Planheit der Glasplatten fast immer zu erreichen. Diese Versuche sind selbstverständlich ohne Anlegen eines elektrischen Feldes auszuführen. Legt man nun ein elektrisches Feld an und führt an einer Stelle ein Farbstoffgemisch kontinuierlich zu, dann zeigt die geradlinige Führung der getrennten Farbstoffzonen die Homogenität und die Gleichförmigkeit der Strömung an (vgl. dazu Abb. 14).

Die Geschwindigkeitsverteilung der Pufferströmung in Richtung Schichtdicke ist experimentell nur sehr schwer zu ermitteln, sie kann aber nach folgender Gleichung errechnet werden:⁴¹⁾

$$v = \frac{3}{2} V_m \cdot \left(1 - \frac{Z^2}{a^2} \right) \quad (20)$$

v = Geschwindigkeit am Ort Z in cm/sec; V_m = mittlere Geschwindigkeit in cm/sec; Z = Abstand von der Mitte (Ort Z) in cm; $2a$ = Plattenabstand in cm.

Die nach dieser Gleichung ermittelten Verhältnisse, wie sie bei den praktischen Durchströmungsgeschwindigkeiten der Trennkammer und dem üblichen Plattenabstand von 0,5 mm gegeben sind, zeigt Abb. 12.

Aus der Darstellung der Abb. 12 geht hervor, daß bei mittleren Pufferdurchlaufgeschwindigkeiten von einer halben bis zu einer Stunde pro 50 cm (Kurve I und II) die Unterschiede der Geschwindigkeitsverteilung immerhin beachtlich sind. Erst bei noch geringeren Durchlaufgeschwindigkeiten, also z.B. 50 cm in zwei Stunden, sind die Abweichungen praktisch zu vernachlässigen (Kurve III).

Da aber auch infolge des ζ -Potentials der Glasoberfläche an der Berührungsstelle mit dem Pufferfilm ein geringeres elektrisches Feld herrscht, kompensieren sich diese beiden Effekte zumindest teilweise, wenn sie auch von der Art des verwendeten Puffers, vom Plattenmaterial und von anderen Faktoren, wie Strömungsgeschwindigkeit der Pufferlösung und Größe

des elektrischen Feldes, stark abhängig sind.

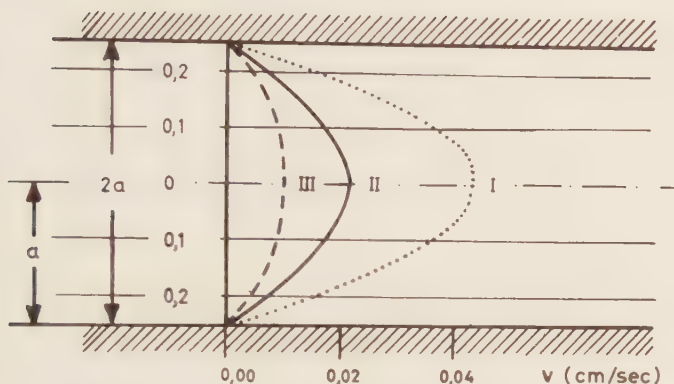


Abb. 12

Verteilung der Pufferfilm-Strömungsgeschwindigkeit
in Richtung Schichtdicke. (Berechnet nach Gleichung 20)

Plattenabstand: 0,5 mm

Strömungsgeschwindigkeitsverteilung bei einer mittleren
Durchflußgeschwindigkeit (V_m) von 100 cm/Std. (I);
50 cm/Std. (II); 25 cm/Std. (III)

In der Praxis hat sich jedoch gezeigt, daß durch diese Einflüsse eine Verbreiterung der Zonen nicht oder nur in sehr geringem Maße festzustellen ist. Das gleiche gilt übrigens für die reine Thermodiffusion.

Für die hier vorliegende lineare Diffusion gilt das I. und II. Fick'sche Gesetz:

$$J = -D \frac{dc}{dx} \quad \text{bzw.} \quad (21)$$

$$\frac{dc}{dt} = \frac{d}{dx} \left(D \frac{dc}{dx} \right) \quad (22)$$

J = Diffusionsstrom; D = Diffusionskonstante; c = Konzentration; x = Koordinate in Richtung der Feldlinien;
 t = Zeit

Unter der in erster Näherung gültigen Annahme einer Rechteckverteilung beim Eintritt der Substanz in die Kammer und Konzentrationsunabhängiger Diffusion läßt sich die Verbreiterung der Zonen abschätzen.

Die Lösung der Gleichung (22) für die Anfangsbedingungen, also

$$\text{für } t = 0 : \quad \begin{array}{ll} c = c_0 & \text{für } -h < x < +h \\ c = 0 & \text{für } |x| > h \end{array}$$

ist gegeben durch

$$c(x,t) = \frac{c_0}{2\sqrt{Dt}} \int_a^x \exp(-\xi^2) d\xi \quad \text{oder} \quad (23)$$

$$c(x,t) = \frac{c_0}{2} \left[\Phi\left(\frac{h+x}{\sqrt{Dt}}\right) + \Phi\left(\frac{h-x}{\sqrt{Dt}}\right) \right] \quad (24)$$

$$a = \frac{x+h}{\sqrt{Dt}} \quad b = \frac{x-h}{\sqrt{Dt}}$$

wobei Φ das Gauß'sche Fehlerintegral

$$\Phi(z) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^z e^{-\eta^2} d\eta \quad (25)$$

ist⁴²⁾.

Eine Darstellung dieser Verteilung für verschiedene Diffusionskonstanten ist in Abb. 13 wiedergegeben, und zwar für eine Trenndauer von 1 Stunde. Die angenommenen Diffusionskonstanten von $5 \cdot 10^{-7}$ bis $100 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{sec}$ umfassen den in Frage kommenden Bereich (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1

Molekulargewichte (MG) u. Diffusionskonstanten (D)
einiger Substanzen

	MG · 10 ⁻³	D _{20°} · 10 ⁷ cm ² sec ⁻¹
Glycin	0,075	106,4*
β-Alanin	0,089	93,3*
Ribonuclease	12,7	13,6*
Carboxypeptidase	--	8,68
Chymotrypsin	--	7,1
Insulin	41-48	8,2
Ovalbumin	44	7,7
Hämoglobin	63-68	6,3
Albumin (Humanserum)	69-72	6,1
γ-Globulin (Humanserum)	176	3,8
Nucleohiston	2300	0,93

*gemessen bei 25°C
Daten aus 43).

Wie aus Abb. 13 zu ersehen ist, vergrößert sich, selbst im ungünstigsten Falle (z.B. Glyzin), die Halbwertsbreite infolge Thermodiffusion von 4 mm (an der Eintrittsstelle) nur auf ca. 7 mm an der Entnahmestelle. Das bedeutet, daß sich die Trennzone, selbst einer Substanz mit sehr hoher Diffusionskonstante, bei der relativ langen Trenndauer von 1 Stunde nur maximal um je ein Auffanggläschen nach beiden Seiten verbreitert.

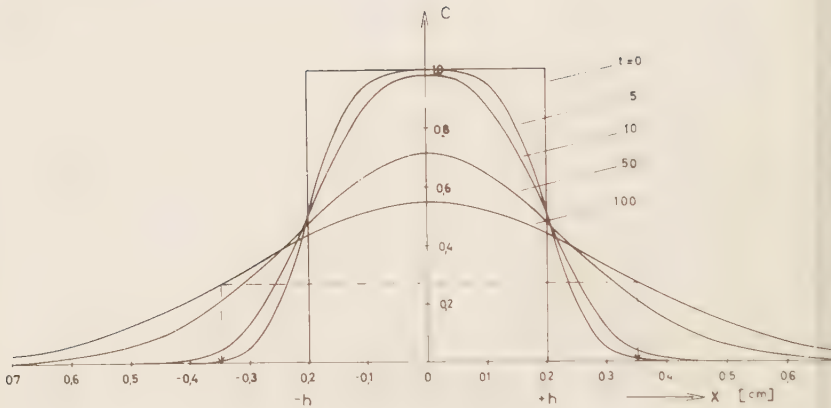


Abb. 13

Verbreiterung der Zonen durch Thermodiffusion

Die Kurve $t = 0$ gibt die in 1. Näherung angenommene Rechteckverteilung am Eintritt in die Kammer, die Kurven 5 bis 100 geben die Konzentrationsverteilung am Austritt nach 1 Stunde Trenndauer wieder. Die angeschriebenen Zahlen stellen die Diffusionskonstanten $\cdot 10^7 \text{ cm}^2 \text{ sek}^{-1}$ dar.

x = Koordinate in Richtung der Feldlinien

d) Einflüsse durch die Oberflächenbeschaffenheit der Glasplatten

Wie schon erwähnt, können Einflüsse auf die Pufferströmung infolge des Oberflächenpotentials der Glasplatten gegenüber dem an die Oberflächen angrenzenden Pufferfilm

nicht ausgeschlossen werden. Die Größe der daraus resultierenden sog. elektroosmotischen Flüssigkeitsströmung ist aber in der trägerfreien Ablenkungselektrophorese wegen der viel kleineren Oberfläche gegenüber Anordnungen, die mit porösem Trägermaterial arbeiten, praktisch zu vernachlässigen.

Um einen Anhaltspunkt über die Größe der elektroosmotischen Strömungen zu gewinnen, wurden für drei verschiedene Puffergemische von unterschiedlichem pH bei angelegtem elektrischem Feld und sonst vergleichbaren Versuchsbedingungen elektro-phoretisch nicht wanderndes, ungeladenes Dextran 13) in 0,2 %iger Lösung an einer Stelle der Trennkammer zugeführt. Durch Farbreaktion mit Orcin-Schwefelsäure 44) wurde die Fraktionsnummer ermittelt, in der das Dextran nach Durchlauf durch die Kammer angekommen war. Wie aus dem Versuchsergebnis in Abb. 14 hervorgeht, sind die Differenzen zwischen Eintritts- und Austrittsstelle der ungeladenen Substanz praktisch zu vernachlässigen. Damit ist bewiesen, daß der Einfluß der elektroosmotischen Strömung in der trägerfreien kontinuierlichen Elektrophorese unbedeutend ist.

Das gleiche gilt auch für die Adsorption von Stoffen an Glaswänden. Lediglich bei der Trennung von stark basischen Farbstoffen wurden bei guter Durchspülung der Trennkammer Verluste von maximal 2-3 % festgestellt. Wenn die Scheiben silikonisiert wurden, konnten sie vollkommen vermieden werden; die Ausbeute war hundertprozentig. Das Silikonisieren der Glasscheiben bringt in Bezug auf elektroosmotische Einflüsse keine wesentliche Änderung, so daß im allgemeinen auf diese Oberflächenbehandlung der Glasplatten verzichtet werden kann.

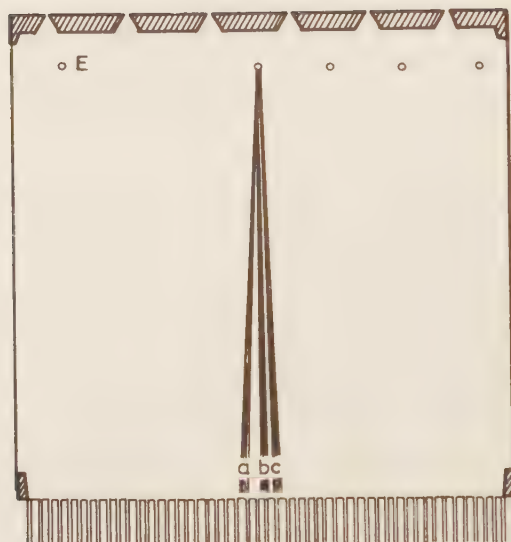


Abb. 14

Ablenkung ungeladener Substanzen (Dextran) durch elektroosmotische Einflüsse

a = 1 n Essigsäure, pH 2,3; 2200 Volt, 100 mA;

b = Acetatpuffer, pH 4,9; 2000 Volt, 200 mA;

c = Trispuffer, pH 8,6; 2200 Volt, 160 mA; Durchflußgeschwindigkeit = 50 cm/Std.

3. Trennbeispiele

a) Trennung einer Farbstoffmischung

Am Beispiel einer Farbstoffmischung soll zunächst gezeigt werden, daß die Wanderungswege durch die Apparatur sehr geradlinig verlaufen und die Zonen äußerst scharf gehalten werden können. Eine Verbreiterung der Zonen durch Diffusion oder andere Effekte ist überraschend gering (vgl. Abb. 15).



Abb. 15

Farbstofftrennung (Wanderungswege während der Trennung)

Synthetische Mischung aus gleichen Teilen von Bromphenolblau, Kresolrot, Säurefuchsin und Kresolpurpur. Pyridinpuffer pH 4,9; 2000 Volt, 140 mA; Durchlaufgeschwindigkeit des Pufferfilms = 50 cm/Std.

Zur Auftrennung gelangte eine Mischung aus gleichen Teilen Bromphenolblau, Bromkresolgrün, Kresolrot, Säurefuchsin und Kresolpurpur (100 mg Farbstoffmischung in 10 ml Puffer gelöst). Als Transportmedium wurde ein Essigsäurepyridin-

puffer, bestehend aus 100 ml Eisessig + 80 ml Pyridin in 30 l Wasser verwendet, der pH-Wert betrug 4,9. Bei einer angelegten Spannung von 2000 Volt (140 mA), betrug die Strömungsgeschwindigkeit durch die Trennkammer etwa 50 cm pro Stunde.

b) Auftrennung von Abbaupeptiden

Zur Auftrennung von Abbaupeptiden, die durch enzymatische Spaltung von Gelatine durch aufeinanderfolgende Einwirkung von kristallisiertem Pepsin, Trypsin und Chymotrypsin erhalten worden waren, wurde Acetatpuffer, pH 4,9, verwendet. Die Spannung betrug 1900 Volt (200 mA). Der Durchsatz betrug 150 mg Abbaugemisch in der Stunde ; es wurden innerhalb von 5 Tagen 18 g in kontinuierlicher Arbeitsweise aufgetrennt. Die Verteilung der in den Auffanggläschen gesammelten Fraktionen wurde täglich durch Ninhydrinanfärbung nach Hydrolyse ermittelt.

Abb. 16 zeigt die graphische Auswertung der Meßergebnisse. Während der gesamten Versuchsdauer blieb die Verteilung vollkommen konstant, die einzelnen Fraktionen konnten täglich ihren gleichen zugehörigen Auffanggläschen entnommen werden.

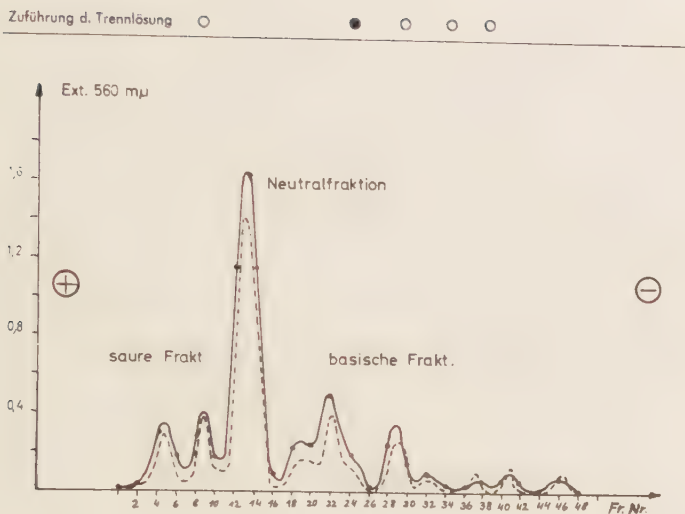


Abb. 16

Auftrennung von Abbaupeptiden

Stufenweiser Abbau von Gelatine durch Hydrolyse mit Pepsin, Trypsin und Chymotrypsin. Verteilungskurve der Ninhydrinanfärbung in den Aufanggläschen. Durchsatz = 150 mg/h; Durchlaufgeschwindigkeit des Pufferfilms = 40 cm/Std. (Acetatpuffer pH 4,9, $\kappa = 0,0022 \Omega^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) 1900 V, (200 mA)

— Test am 1. Versuchstag; - - - Test am 5. Versuchstag

c) Reinigung einer Elastase-Rohfraktion

Das Beispiel in Abb. 17 zeigt die Auftrennung einer Elastase-Rohfraktion. Für die Trennung wurde ein Acetatextrakt von Pankreatin eingesetzt, der vorher durch Ammonsulfatfällung bis zu einer Aktivität von 17,5 Elastaseeinheiten angereichert worden war⁴⁵⁾. Durch die Elektrophorese bei pH 7,6 in Trispuffer (Tris(hydromethyl)-Amino-

methan) (9,1 g Tris + 7,1 g Ca-acetat in 5 l dest. H_2O gelöst und mit n/10 HCl auf pH 7,6 eingestellt) und in Gegenwart von Ca-Ionen gelang die Abtrennung der wesentlichen Begleitproteine, so daß die spezifische Aktivität der Fermentfraktion 220 Elastaseeinheiten betrug. Das bedeutet eine Anreicherung um nahezu das 13-fache bei einer Gesamtausbeute von 96 % der Aktivität durch einen einzigen Trennschritt. Die gefriergetrocknete Fraktion lag in der Aktivität um über 25 % höher als die bisher in der Literatur beschriebenen wirksamsten Präparate⁴⁶⁾.

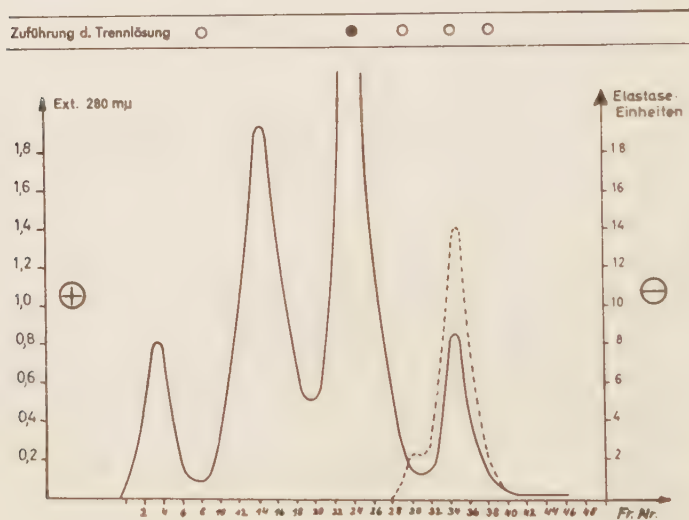


Abb. 17

Reinigung einer Elastase-Rohfraktion

Trispuffer pH 7,6; (9,1 g Tris + 7,1 g Ca-acetat auf 5 l dest. H_2O , mit n/10 HCl eingestellt);
 $\chi = 0,0019 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-1}$; 2000 Volt, 160 mA; Durchsatz = 45 mg Rohfraktion/Std.; Durchlaufgeschwindigkeit des Pufferfilms = 50 cm/Std.;
 Verteilungskurven = _____ Protein (Ext. 280 m)
 - - - - - Aktivitätstest³⁵⁾

d) . R e i n i g u n g k ä u f l i c h e r R o h -
k o l l a g e n a s e ⁴⁷⁾

Abb. 18 zeigt als weiteres Beispiel einer Ferment-
reinigung die Auftrennung eines Kollagenasepräparates,
wie es im Handel erhältlich ist (Worthington Biochemical
Corp., New Jersey; Nr. 6142-4). Im vorliegenden Fall ist
es zwar nicht gelungen, die Komponente mit Kollagenase-
aktivität (gestrichelte Linie) von einer noch vorhandenen
Komponente mit Amidaseaktivität (punktierte Linie) zu
trennen; durch die Abtrennung eines sehr großen Anteils
von Begleitproteinen konnte jedoch auch hier eine An-
reicherung der Kollagenaseaktivität auf das 8-fache bei
praktisch 100 %iger Ausbeute der insgesamt eingesetzten
Aktivität erreicht werden.

e) A u f t r e n n u n g v o n S e r u m p r o t e -
i n e n

Am Beispiel einer Serumtrennung soll gezeigt werden, wie
es gelingt, auch in geringer Menge vorhandene Einzel-
fraktionen aus kompliziert zusammengesetzten Proteinge-
mischen mit ähnlicher elektrophoretischer Beweglichkeit
zu isolieren, bzw. anzureichern. Abb. 19 zeigt das
gewohnte Bild einer Serumeiweißverteilungskurve, wie sie
auch bei der Papier-Elektrophorese erhalten wird.

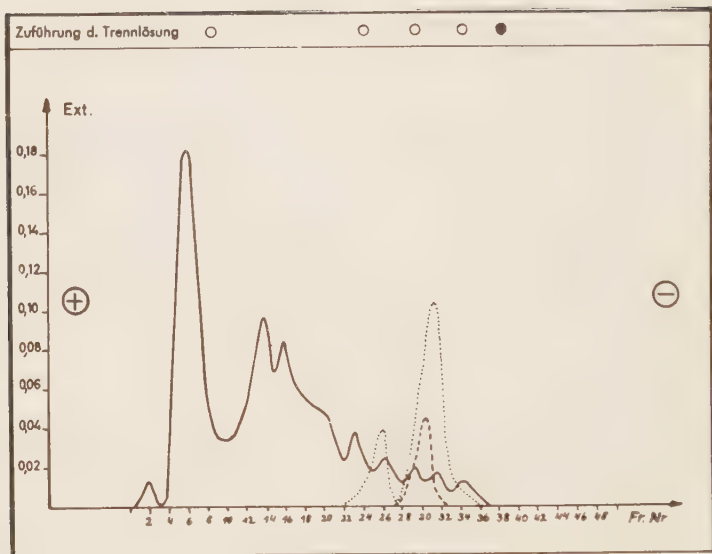


Abb. 1b

Reinigung von Kollagenase

(Produkt: Worthington Biochemical Corp., New Jersey, (Chargen-Nr. 6142-4))
 Trispuffer pH 8,9 (10,3 g Tris + 6,7 g Ca-acetat auf 5 l H₂O, mit 1 n HCl auf pH 8,9 und mit 1 m Na-acetat auf eine Leitfähigkeit $\kappa = 0,0022 \Omega^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ gebracht);
 1700 Volt, 210 mA; Durchsatz = 40 mg/Std; Durchlaufgeschwindigkeit des Pufferfilms = 55 cm/Std.

Extinktion bei 230 m μ ; Kollagenaseaktivität⁴⁷⁾; Amidaseaktivität⁴⁷⁾

Von den etwa 150 nachweisbaren Serumeiweißkörpern sind bisher nur etwa 30 rein dargestellt und elektrophoretisch charakterisierbar. Wegen dieser heterogenen Zusammensetzung des Blutserums ist es nicht verwunderlich, daß das Bild einer solchen Eiweißverteilungskurve weniger scharf erscheint und die Minima nicht bis zur Basis absinken, da auch in den Zwischenbereichen Protein vorhanden ist.

Für die Auftrennung der Serumproteine hat sich in letzter Zeit ebenfalls Trispuffer von pH 8,6 bewährt.

Der Puffer wird aus 9,7 g Tris (Tris-(hydroxymethyl) amino-methan) pro Liter bereitet. Zur Einstellung des pH-Wertes werden etwa 45 ml 2 molarer Zitronensäure zugefügt. Für gute Trennungen empfiehlt es sich, das zur Trennung gelangende Serum vorher gegen den gleichen Puffer zu dialysieren. Die Proteinkonzentration soll auf etwa 2-3 % eingestellt werden, so daß normales Serum etwa auf das 3-fache verdünnt werden muß. Im Beispiel der Abb. 19 erfolgte die Trennung bei 2300 V, was einer Feldstärke von etwa 45 V/cm entspricht. Die Strömungsgeschwindigkeit des Pufferfilms betrug 45 cm/Std., wobei 40 mg Serumproteine (bezogen auf Trockengewicht) pro Stunde durchgesetzt werden können.

Zuführung d. Trennlösung ○ ○ ○ ○ ●

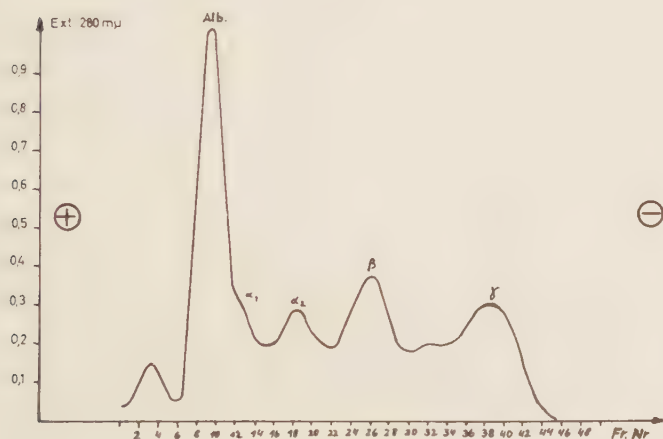


Abb. 19

Auftrennung der Serumproteine
(normales Humanserum)

Trispuffer pH 8,6 (48,5 g Tris in 5 l H₂O, mit 2 m₁.cm⁻¹); Zitronensäure auf pH 8,6 gebracht; $\kappa = 0,0016 \Omega^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$); 2300 V, 160 mA; Durchsatz = 40 mg Serumprotein pro Std.; Durchlaufgeschwindigkeit des Pufferfilms = 45 cm/Std.

Die Abtrennung der α_1 -Globulin-Fraktion gelingt bekanntlich in der freien Elektrophorese weniger gut, weil die Adsorptionseffekte fehlen, die bei der diskontinuierlichen Papierelektrophorese rein zufällig die Abtrennung der α_1 -Fraktion vom Albumin begünstigen. In einem zweiten Trennversuch wurden dann nochmals unter gleichen Bedingungen zwei Fraktionen, nämlich Fraktion Nr. 12 und 13 aus dem Versuch der Abb. 19, also dem α_1 -Bereich, durch die Trennapparatur gesetzt. Das Ergebnis ist in Abb. 20 dargestellt. Wie das Ergebnis zeigt, ist nunmehr die α_1 -Fraktion recht deutlich von dem noch begleitenden Albumin und einer geringen Menge α_2 -Globulin abgetrennt worden.

Zuführung d. Trennlösung ○ ○ ○ ○ ●

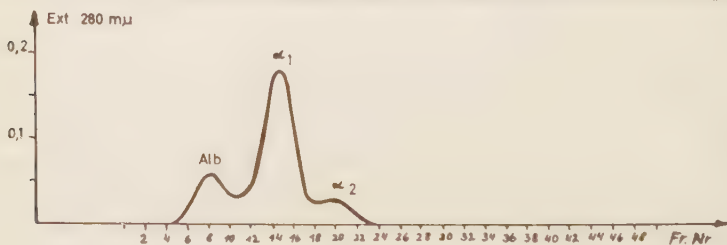


Abb. 20

Darstellung der α_1 -Fraktion

2. Fraktionierung der Fraktion 12 und 13 aus dem Versuch der Abb. 19, gleiche Versuchsdaten wie in Abb. 16, jedoch Durchsatz der Mischung der Fraktionen 12 und 13=3 ml/Std.

Bei den bisher beschriebenen Trennbeispielen wäre es ohne weiteres möglich gewesen, gute Trennungen auch in der heterogenen kontinuierlichen Elektrophorese zu erreichen. Trotzdem besteht in allen Fällen die besonders scharfe

Abgrenzung der Fraktionen in der trägerfreien Ausführung, die eine exaktere Auftrennung ermöglicht.

f) Abtrennung von Pepsin aus Tropokollagenlösungen

Mit Pepsin behandelt geht natives, faserförmiges Kollagen unter Auflösung von Quervernetzungen in nativer Form in Lösung, wobei die monomeren sogenannten Tropokollagenmoleküle mit einem Molekulargewicht von etwa 350 000 in ihrer langen stäbchenförmigen Gestalt von etwa 2 800 Å vorliegen.

Zuführung d. Trennlösung ○

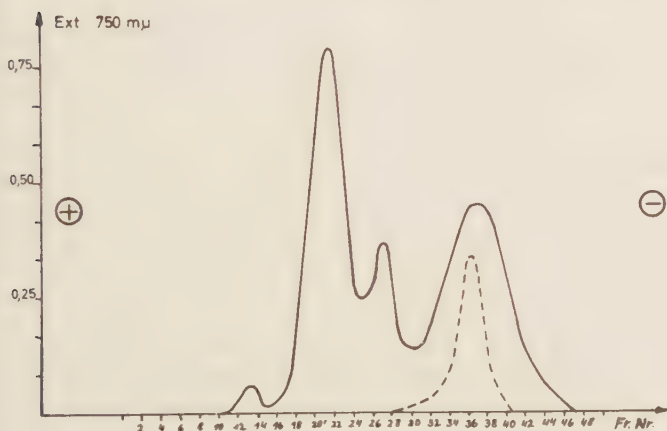


Abb. 21

Abtrennung von Pepsin aus einem Kollagenpräparat
(Mischungsverhältnis 1 : 2)

1 n Essigsäure, pH 2,3; 2250 Volt, 100 mA; Durchsatz = 15 mg/Std.; Durchlaufgeschwindigkeit des Pufferfilms = 45 ml/Std.;

Verteilungskurven = _____ Lowry-Test⁴⁸⁾
 _____ Pepsinaktivität⁴⁹⁾

Für die weitere Untersuchung dieses löslichen Kollagens, das übrigens noch in der Lage ist, Fibrillen zu bilden, war es entscheidend, das Pepsin wieder vollkommen abzutrennen. Dies gelang in der erforderlichen Exaktheit ebenfalls in der trägerfreien Elektrophorese. In der Trägerelektrophorese wäre das Kollagen als Faserprotein zum größten Teil durch Adsorption am Trägermaterial haften geblieben.

Abb. 21 zeigt das Ergebnis der Trennung. Die Eiweißverteilungskurve wurde nach Anfärbung mittels Lowry-Test und Extinktionsmessung bei 750 m μ erhalten (ausgezogene Linie). Die gestrichelte Linie in der Abbildung stellt die Kurve der Pepsinaktivität dar (gemessen nach der Methode von Anson⁴⁹⁾). Die Trennung erfolgte bei pH 2,5 in 0,5 n Essigsäure bei einer angelegten Spannung von 2250 V und 100 mA. Neben den beiden Hauptkomponenten, nämlich Kollagen und Pepsin, sind noch zwei weitere kleine Fraktionen erhalten worden, die bisher nicht näher untersucht sind.

g) Reinigung von einsträngigen DNS-Phagen des Bacterium coli (Escherichia).

Die nähere Untersuchung dieses Stammes mit einem Molekulargewicht von etwa 10 Millionen und fadenförmiger Gestalt wird zur Zeit im MPI für Biochemie von Braunitzer und Hobom⁵⁰⁾ vorgenommen. In Zusammenarbeit mit unserem Institut konnten in der trägerfreien Elektrophorese Trennbedingungen gefunden werden, die es erlaubten, die Wildformen der Phagen und deren Mutanten quantitativ zu trennen. Der Nachweis der Mutan-

ten gelang im "Plaque-Test"*. Bei der Beurteilung der Verteilungskurve in Abb. 22 muß der logarithmische Ordinatenmaßstab berücksichtigt werden (die Ordinate verläuft über 6 Zehnerpotenzen, so daß bei linearer Darstellung der Gipfel viele Kilometer weit weg liegen würde).

Es gelang, die Mutanten nach ihrer elektrophoretischen Abtrennung hochzuzüchten. Nach erneuter Elektrophorese hatte die elektrophoretische Beweglichkeit keine Änderung erfahren (vgl. dazu Abb. 22, unterbrochene Linien). Herr H o b o m konnte auf diese Weise nach dreimaliger Wiederholung der Hochzüchtung und der elektrophoretischen Trennung eine fast vollkommen einheitliche Mutante erhalten.

Es bleibt noch zu erwähnen, daß es vorher weder durch Chromatographie noch mittels Trägerelektrophorese gelang, diese Phagen zu trennen.

In der Zwischenzeit wurde die Apparatur zur Lösung verschiedener Trennaufgaben auch von anderen Autoren⁵¹⁾, teilweise in Zusammenarbeit mit uns eingesetzt.

So gelang z.B. die Auftrennung und Isolierung von Pflanzen- und Blütenfarbstoffen (R.L.M. S y n g e; L. F r i t s c h e)^{51a)}, die präparative Herausarbeitung einzelner Proteine und Enzyme aus Plasma und Serum (H. B e n n h o l d; H.J. R a a p)^{51b)}, die Auftrennung von vorge-

*Zur Ausführung des "Plaque-Testes" wird ein Teil der Phagensuspension und die Indikatorbakterien mit flüssigem Agar gemischt und auf eine fertige Agarplatte in einer Petri-Schale überschichtet. In der erstarrten Oberschicht bildet sich während der Inkubation bei 37°C ein dichter Bakterienrasen. Um die einzelnen Bakteriophagen tritt durch die fortschreitende Infektion Bakteriolyse ein, die sich kreisförmig ausbreitet und schließlich als Loch im Bakterienrasen (Plaque) sichtbar wird. Die Summe der Plaques gibt die Zahl der Phagen an, die dem Oberschichtträger beigemengt waren.

reinigten Extrakten aus Leber (E. H a a g)^{51c}, Thymus (K. H a n n i g u. J. C o m s a)^{51d} und Magenschleimhaut (H. A p p e r t)^{51e}, die Reinigung von Lactat-Dehydrogenase (J. M a r k e r t)^{51f}, oder die Isolierung einiger Proteine aus "Kidney"-Bohnen (W. J a f f e u. K. H a n n i g)^{51g} u.a.

Zuführung d. Trennlösung ○ ○ ○ ○

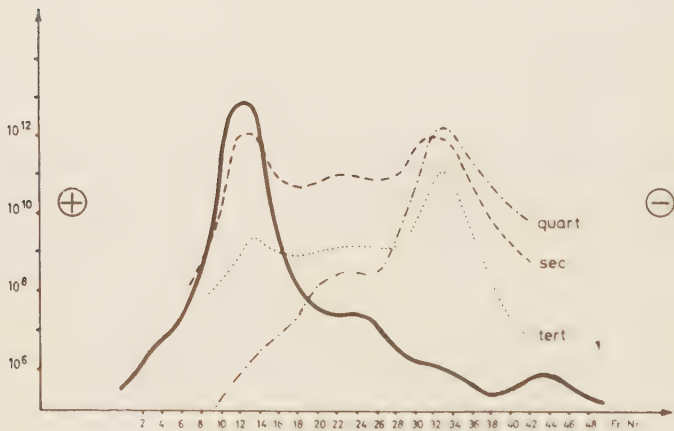


Abb. 22

Reinigung von DNS-Phagen des Bacterium coli (Escherichia)
Acetatpuffer pH 4,3 (63,0 g Na-acetat 3 H₂O + 20 ml
Eisessig in 5 l H₂O; $\kappa = 0,0024 \Omega^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), 1900 Volt,
190 mA. Durchlaufgeschwindigkeit des Pufferfilms =
25 cm/Std., Biologischer Test = Plaque-formende Einheiten

- 1. elektrophoretische Trennung
- - - 2. Trennung nach Hochzüchtung einer Mutante
- 3. Trennung nach Hochzüchtung
- . - . 4. Trennung nach Hochzüchtung

II. T E I L

Die vertikale Anordnung der
trägerfreien Ablenkungselek-
trophorese und ihre Anwendung
auf zytologische Probleme.

1. Einleitung und Problemstellung

Die elektrophoretische Untersuchung von Zell- oder Bakterienpopulationen wurde wegen der großen Bedeutung von Oberflächenproblemen und zur näheren Charakterisierung einzelner Zellarten, bzw. Bakterienstämme schon sehr frühzeitig versucht. Die wesentlichen theoretischen Voraussetzungen der Zellelektrophorese waren Anfang dieses Jahrhunderts bereits abgeschlossen. Die praktische Verwertbarkeit dieser Methode für wissenschaftliche Untersuchungen blieb aber wegen der großen technischen Schwierigkeiten, mit denen sie belastet war, bis vor kurzem gering (F. R u ë f f)⁵²⁾.

Bereits zu Beginn dieses Jahrhunderts wurden Bestimmungen der elektrophoretischen Beweglichkeit von Erythrozyten (H ö b e r 53), A b r a m s o n 54)), sowie ihres isoelektrischen Punktes (A b r a m s o n u. M o y e r) 55) versucht.

In einer Dissertationsarbeit berichtete 1939 P r z y r e m b e l 56) über elektrophoretische Trennversuche an einigen Bakterienstämmen der Diphtheriebazillengruppe. In einer kleinen Elektrophoresekammer, die aus zwei, in geringem Abstand voneinander gehaltenen Objektträgern gebildet wurde, konnte gezeigt werden, daß einzelne Stämme unterschiedliche Ladungen tragen und somit verschieden schnell wandern.

Größere Zusammenfassungen über die Methoden und Ergebnisse der Zell- und Bakterienelektrophorese stammen von A b r a m s o n u. Mitarb. 57) und in neuerer Zeit u.a. von R u h e n s t r o t h - B a u e r u. S a c h t l e b e n 58), sowie von R u ë f f 52). Über theoretische Grundlagen der Zellelektrophorese finden sich Übersichten bei T h o m p s o n 59), P i p e r 60), S t e r n 61), B r i n t o n u. L a u f e r 62), sowie von R u h e n s t r o t h - B a u e r u. S a c h t l e b e n 58).

Es ist vor allem das Verdienst von R u h e n s t r o t h - B a u e r u. Mitarbeitern⁶²⁾, die diskontinuierliche

Elektrophorese in Mikroammer-Anordnungen zu einer für analytische Zwecke brauchbaren und zuverlässigen Methode entwickelt und sie für die klinische Diagnostik eingeführt zu haben.

In einer kühlbaren Elektrophoreseammer aus Duran-50-Glas mit den Abmessungen 40 mm : 14 mm : 0,65 mm können durch mikroskopische Betrachtung bei bis 800-facher Vergrößerung mit Hilfe eines Objektmikrometers die Wanderungsgeschwindigkeiten einzelner Zellen bestimmt werden. An den beiden Enden der Längsachse der Kammer befinden sich die Einfüllstutzen sowie die Spezialverbindung zu den unpolarisierbaren Elektroden.

Aus den Untersuchungen von R u h e n s t r o t h - B a u e r und Mitarb.⁶²⁾ wurde bekannt, daß bei bestimmten Krankheiten Potentialveränderungen der Membranen von Leukozyten im peripheren Blut zu beobachten sind, so bei Leukämie, Lymphogranulomatose, Knochenmetastasen, malignen Tumoren und Lupus erythematoses mit L.E.-Zellen im Blut. Über die Frage nach Herkunft und Ursache von Leukozyten mit einer von der Norm abweichenden Oberflächenladung am Blut von Menschen und Tieren, an Sternalmarkzellen Gesunder und Kranker, an Zellen aus normalen und pathologisch veränderten Lymphknoten berichtete kürzlich R u e f f ⁵²⁾.

Diese Anordnungen eignen sich nicht für Trennungen im präparativen Maßstab; die mit ihnen erhaltenen Ergebnisse waren aber für unsere Versuche zur präparativen Isolierung von Zellen und Zellfragmenten in der kontinuierlichen Ablenkungselektrophorese wertvoll, denn sie zeigten, daß die einzelnen Zellarten sehr charakteristische, wenig streuende Beweglichkeitswerte aufweisen und sie erleichterten die richtige Auswahl der Versuchsbedingungen.

Unsere Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Herrn R u h e n s t r o t h - B a u e r (MPI für Bio-

chemie, München) ausgeführt. In ersten Ergebnissen zeigte sich, daß Aufschlammungen oder Suspensionen von Blut-Zellen in der trägerfreien Elektrophoreseanordnung mit einer überraschenden Trennschärfe möglich sind. In der Apparatur mit der aus Gründen der guten Pufferfilmstabilität waagerecht oder schwach schräg gestellten Kammer war es jedoch nicht zu vermeiden, daß eine Verschmutzung der unteren Glasplatte durch sedimentierende Partikelchen eintrat, die schon sehr bald eine weitere Trennung unmöglich machte. Eine vollkommen vertikale Anordnung der Trennkammer, bei der die Sedimentation in Richtung der Flüssigkeitsströmung und somit ohne Störung erfolgen könnte, stößt aber auf große experimentelle Schwierigkeiten. Störungen durch Thermokonvektion sind hierbei besonders leicht möglich. Temperaturunterschiede von nur wenigen hundertstel Grad/cm ergeben unkontrollierbare, unkonstante Strömungsverhältnisse, die eine Trennung vollkommen unmöglich machen.

Da sich gezeigt hat, daß die vorhandene Luftkühlung in einer Kammer mit den Abmessungen 50 x 50 cm nicht mehr ausreicht, eine genügende Temperaturkonstanz zu erreichen, wurde zunächst versucht, durch Verkleinerung der Kammer eine bessere Stabilität des Pufferfilms und eine gleichmäßigere Temperaturverteilung zu erzielen.

Abb. 23 zeigt eine Ausführung dieser Apparatur mit einer Trennfläche von 20 cm Breite und 25 cm Höhe. Bei gleicher Kühlluftanordnung wie in der großen Ausführung der waagerechten Trennkammer wurde eine ausreichende Temperaturkonstanz des Pufferfilms erreicht, so daß auch in vertikaler Lage Thermokonvektion ausgeschaltet war. Bei der Trennung von Kaninchen- und Humanerythrocyten (vgl. Abb. 23) konnten annähernd geradlinige Wanderungswege der Fraktionen aufrechterhalten werden. Die Verkleinerung der Kammer und die kürzeren Trennwege verringern aber naturgemäß die Trennschärfe.

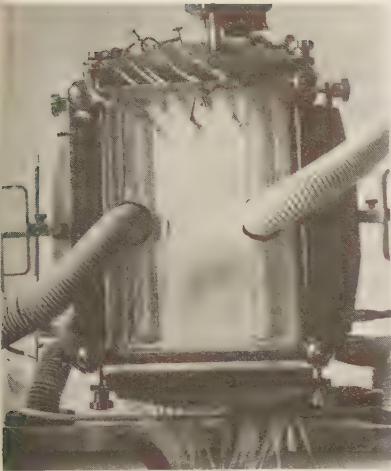


Abb. 23

Gesamtansicht der kleinen
vertikalen Trennkammer mit
Luftkühlung

(Gleicher Aufbau wie die im I. Teil beschriebene Trennkammer mit Luftkühlung, jedoch Trennraum nur 20 x 25 cm) Sichtbar sind die Wanderungswege von Kaninchen- und Humanerythrocyten während ihrer Trennung.

...eine gleichmäßige Temperaturverteilung über eine
...ößere Trennregion zu erzielen, bieten sich folgende Mög-
lichkeiten an:

Verwendung einer verstärkten Luftkühlung

Kühlung durch eine intensive Solekühlung an einer oder
an beiden Seiten der Glasplatten

Auflage der Glasplatten auf Kupferplatten, die ihrer-
seits gekühlt werden und eine gleichmäßige Temperatur-
verteilung durch die hohe Wärmeleitfähigkeit des Metalls
versprechen.

Eine verstärkte Luftkühlung erwies sich als unge-
eignet, da durch die höhere Luftgeschwindigkeit
und Verwendung stärkerer Gebläse die Luft mecha-
nisch zu stark erwärmt wurde.

Auch eine Solekühlung von beiden Seiten der Trenn-
kammer her brachte nicht den gewünschten Erfolg. Die
zur Aufrechterhaltung einer gleichmäßigen Puffer-
filmtemperatur erforderliche große Strömungsge-
schwindigkeit der Sole verursachte starke mechanische
und hydrostatische Beanspruchung der beiden Glas-
platten. Der unbedingt zu fordernde gleichmäßige

Plattenabstand und damit die gleiche Dicke des Pufferfilms ist nicht mehr gewährleistet.

Die Kühlung der Trennkammer durch Auflage der Glasplatten auf gekühlte Kupferplatten erwies sich schließlich als das sicherste Verfahren. Eine äußerst gleichmäßige Kühlung wurde durch die Verwendung von kleinen Kühlbatterien nach dem Peltier-Prinzip möglich, die direkt Strom in Kälte umzuwandeln gestatten. Durch thermostatische Steuerung gelingt hierbei die Regelung der Temperaturkonstanz über den gesamten Trennraum in den geforderten kleinen Toleranzen.

Im folgenden soll der apparative Aufbau der verbesserten Trennkammer beschrieben und über die damit neu erschlossenen Anwendungsmöglichkeiten zur Trennung von Zellen und Zellorganellen berichtet werden.

2. Apparatur mit vertikaler Anordnung der Trennkammer

Abb. 24 zeigt den schematischen Aufbau der Elektrophoresekammer. Auf einer plangeschliffenen etwa 8 mm starken Kupferplatte (1) (48 x 48 cm) sind auf der Rückseite 28 Peltierbatterien (2) (Philipps-Valvo, Typ PT 20/20) gleichmäßig verteilt angebracht. Eine der beiden die Trennkammer bildenden Glasplatten (3) (50 x 50 cm) wird auf die geschliffene Kupferplatte gelegt, wobei Silikonöl (Wacker AK 36 000) als Kontaktmittel zur besseren Wärmeübertragung dient. Das Silikonöl bildet einen sehr dünnen Film und hält die Glasplatte fest auf der Kupferplatte. Zusammen mit einem Isoliermantel (6), der auf die nicht

gekühlte Seite der Glasplatte aufgesetzt wird, kann die ganze Anordnung durch zwei verschraubbare Rahmen zusammengehalten werden. Die beiden Elektrodenkammern (7) mit den Platinelektroden werden an die seitlich geschliffenen Ränder der Trennkammer über eine Gummidichtung angepreßt. Zwischen Trennkammer und Elektrodenkammer wird der elektrische Kontakt durch Zwischenschaltung einer Ionenaustauschermembran hergestellt. Über 6 Zuführstellen (8) an der Oberseite der Glasplatten wird über eine 6-fach-Schlauchpumpe die Pufferlösung gleichmäßig zugeführt. Die eigentliche Trennkammer entspricht in ihrem Aufbau im wesentlichen derjenigen im Teil I beschriebenen Anordnung.

Die Entnahmevorrichtung jedoch besteht in dieser Anordnung aus einer neu, speziell für diesen Zweck entwickelten Vielfachschlauchpumpe mit 50 parallel angeordneten Schläuchen aus Silikongummi (vgl. Abb. 25).

Es hat sich in der Praxis erwiesen, daß diese Art der Entnahme besonders gleichmäßig wirkt.

Abb. 25 zeigt einen Schnitt und die Schemazeichnung der Schlauchpumpe. Eine durch einen Metallkern verstärkte Teflonwelle (1) mit 6 halbkreisförmigen Einfräsungen, in der sechs runde Silberstahlstäbe (2) (4 mm $\varnothing$) gleiten können, bewegt sich in einem Gehäuse aus Plexiglas (3). Zwischen den Rollen und dem oberen Teil des Plexiglasgehäuses liegen 50 parallel angeordnete Schläuche (0,5 mm lichte Weite), die durch Federdruck fest an die Gleitrollen gepreßt werden. Durch die drehende Bewegung wird die Flüssigkeit in den Silikonschläuchen vorwärts bewegt.

Wie die Testversuche zeigten, ist die Förderleistung jedes einzelnen der 50 Schläuche vollkommen gleich. Ihr Verschleiß ist nur gering und die Konstanz über mehrere Wochen ausgezeichnet. (Nach 10-wöchigem Betrieb wurde eine Verminderung der Förderleistung von lediglich 1-2 % festgestellt.)

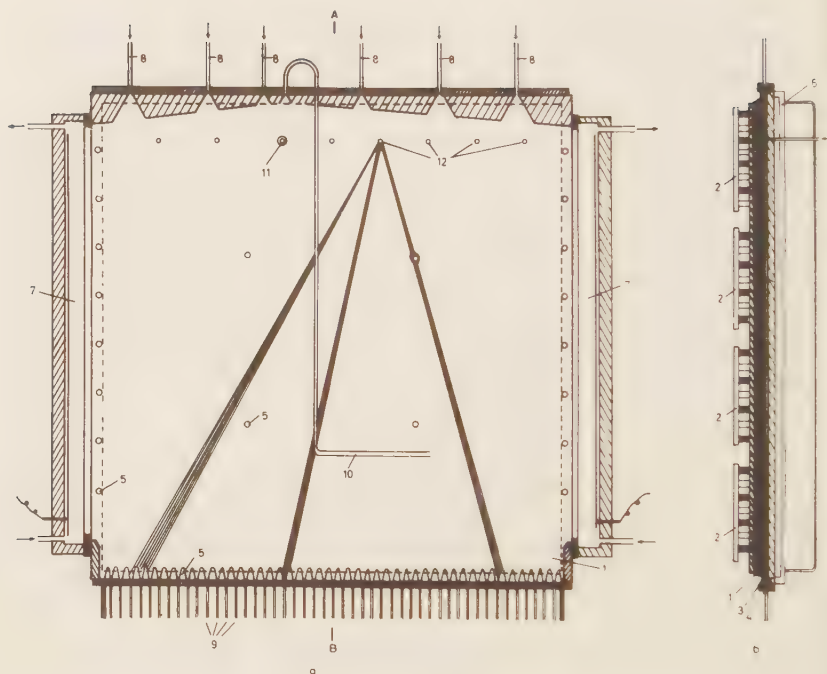


Abb. 24

Schemazeichnung der vertikal angeordneten Trennkammer mit "Peltier-Kühlung"

a) = Frontansicht

b) = Schnitt $\overline{AB}$

1 = Kupferplatte 48 x 48 cm; 2 = Peltier-Batterien (Philips-Valvo; Typ PT 20/20); 3 = Glasplatte 50 x 50 cm (3 mm dick); 4 = Glasplatte 50 x 50 cm (6 mm dick); 5 = Abstandsplättchen (0,5 mm); 6 = Isoliermantel; 7 = Elektrodenkammern; 8 = Pufferzuführungen; 9 = Entnahmeröhrchen zur Schlauchpumpe; 10 = Niveaurohr; 11 = Widerstandsthermometer; 12 = Zuführung des zu trennenden Substanzgemisches.

Da der Pufferfilm von allen Seiten vollkommen abgeschlossen ist, muß dafür gesorgt werden, daß beide Schlauchpumpen, nämlich die für die Pufferzuführung als auch die für die Puffer- und Fraktionsentnahme mit vollkommen gleicher

Förderleistung arbeiten. Dies wurde dadurch erreicht, daß oben an einer Stelle der Kammer eine weitere Öffnung vorgesehen ist, die mit einem Kapillarrohr (10) (Abb. 21) in Verbindung steht, das wie auf der Zeichnung (Abb. 21) dargestellt ist, etwa bis in das untere Drittel der Trennkammer reicht. Das Kapillarrohr dient als Niveaurohr.

Bei Gleichlauf der beiden Pumpen muß der Meniskus im waagerechten Teil an derselben Stelle stehen bleiben. Die Einstellung des Gleichlaufs von Hand aus ist unsicher. Es wurde daher eine automatische Steuerung in der Weise angebracht, daß der untere waagerechte Teil des Niveaurohres als schmale 0,5 mm dicke und 0,5 mm breite und etwa 5 cm lange Küvette ausgebildet wurde, die mit zwei Metallfolien belegt, als Kondensator wirkt. Die Veränderung der Kapazität des Kondensators bei der Bewegung des Flüssigkeitsmeniskus innerhalb der Küvette kann dazu genutzt werden, über eine Kapazitätsmessbrücke mit Verstärkerschaltung den Schlauchpumpenmotor für die Zuführung der Pufferlösung automatisch zu steuern (vgl. Abb. 26).

Das gleiche Kapillarrohr mit der Meßzelle hat gleichzeitig die Aufgabe, als Heber zu wirken, der einen geringen hydrostatischen Unterdruck in der Trennkammer erzeugt. Dadurch wird erreicht, daß die beiden Glasplatten durch den atmosphärisch geringen Überdruck nach innen gedrückt werden und somit die sonst durch den hydrostatischen Druck bedingte Wölbung nach außen kompensieren. Ebenso wie bei der vorher beschriebenen luftgekühlten Trennkammer werden die Glasplatten auch in der Mitte durch 4 Abstandsplättchen von 0,5 mm Stärke gestützt, so daß die gleichmäßige Dicke des Pufferfilms gewahrt bleibt.

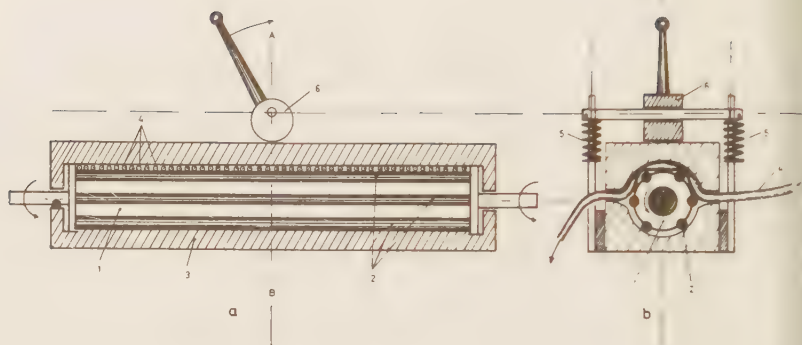


Abb. 25

Schemazeichnung der 50-fach-Schlauchpumpe zur
Entnahme der Fraktionen

a) Frontansicht

b) Schnitt $\overline{AB}$

1 = Teflonwelle mit 6 Längsnuten; 2 = Silberstahlrollen (4 mm $\varnothing$); 3 = Plexiglasgehäuse (2-teilig); 4 = 50 parallel angeordnete Silikonschläuche (0,5 mm l.W.); 5 = Andruckfedern; 6 = Arretiervorrichtung.

Sieben etwa 5 cm unterhalb des oberen Randes der Trennkammer angebrachte Öffnungen (12) (Abb. 24) in der vorderen Glasplatte dienen wahlweise der Zuführung des zu trennenden Substanzgemisches. Sie erfolgt mittels einer speziell dafür entwickelten, kleinen, als Schlauchpumpe ausgebildeten Dosierpumpe (vergl. Abb. 27).

In einem Gehäuse aus Plexiglas ist exzentrisch ein kleines Kugellager drehbar gelagert. Ein eingelegter Silikonschlauch von 0,5 mm lichter Weite und 1 mm Wandstärke wird dadurch kontinuierlich über dem Umfang der Ausdehnung des Plexiglasgehäuses abgequetscht so daß die Flüssigkeit innerhalb des Schlauches kontinuierlich vorwärts bewegt wird. Die Förderleistung

der Dosierpumpe kann entsprechend der Umdrehungs-
geschwindigkeit der Antriebsachse zwischen 0,2 und
etwa 50 ml/Std. kontinuierlich geregelt werden.

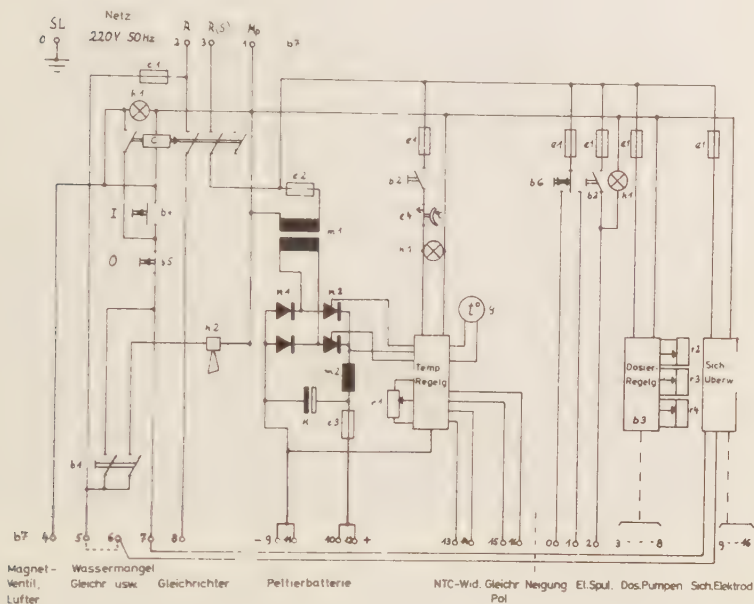


Abb. 26

Prinzipschaltung der Steuerung und Stromversor-
gung der Peltierbatterien, sowie der Pumpmotoren

Die Messung und Regelung der Pufferfilmtemperatur er-
folgt über ein kleines Widerstandsthermometer (11) (Abb. 24),
das ebenfalls durch die vordere Glasplatte in den Puffer-
film eingeführt wird. Die gewünschte Pufferfilmtemperatur
kann über einen Regler eingestellt werden. Die Stromver-
sorgung für die Speisung der Peltier-Batterien wird dabei
über "Thyristoren" gesteuert (vergl. Abb. 26).

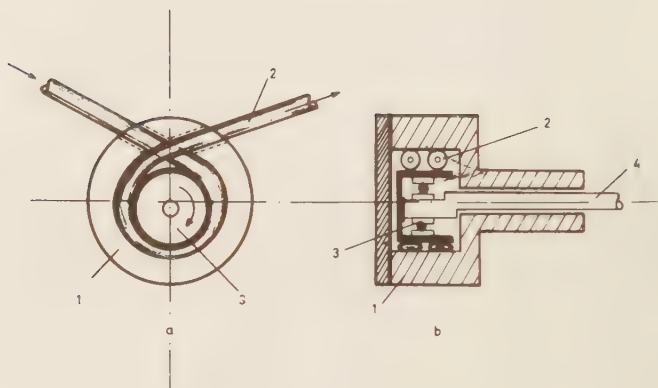


Abb. 27

Schemazeichnung der als Dosierpumpe zur Zuführung des Substanzgemisches dienenden Schlauchpumpe

a = Frontansicht b = Längsschnitt
1 = Plexiglasgehäuse; 2 = Silikonschlauch; 3 = ex-
zentrisch gelagertes Kugellager; 4 = Welle (Antriebs-
achse)

Zur Erhöhung der Sicherheit der Vorrichtung sind noch zusätzliche Einrichtungen vorgesehen. Wenn beispielsweise das Niveau im Niveaurohr (10) (Abb. 24) zu stark abfällt (z.B. bei Undichtigkeit der Kammer), wird, von einer Leitfähigkeitszelle über ein Relais gesteuert, die elektrische Stromversorgung abgeschaltet.

Weiterhin ist eine Einrichtung vorgesehen, die eine Abschaltung der Dosierpumpe über eine Leitfähigkeitszelle bewirkt, wenn der Substanzvorratsbehälter leer gelaufen ist. Nach Abschalten der Dosierpumpe wird durch Steuerung über eine Zeitschaltuhr die Stromversorgung der gesamten Apparatur abgeschaltet, sobald die eingeführte Substanz quantitativ aus dem Trennraum abgeführt ist. (Vergl. dazu das Schaltschema der Abb. 26)

Abb. 23 zeigt den Gesamtaufbau der Apparatur.

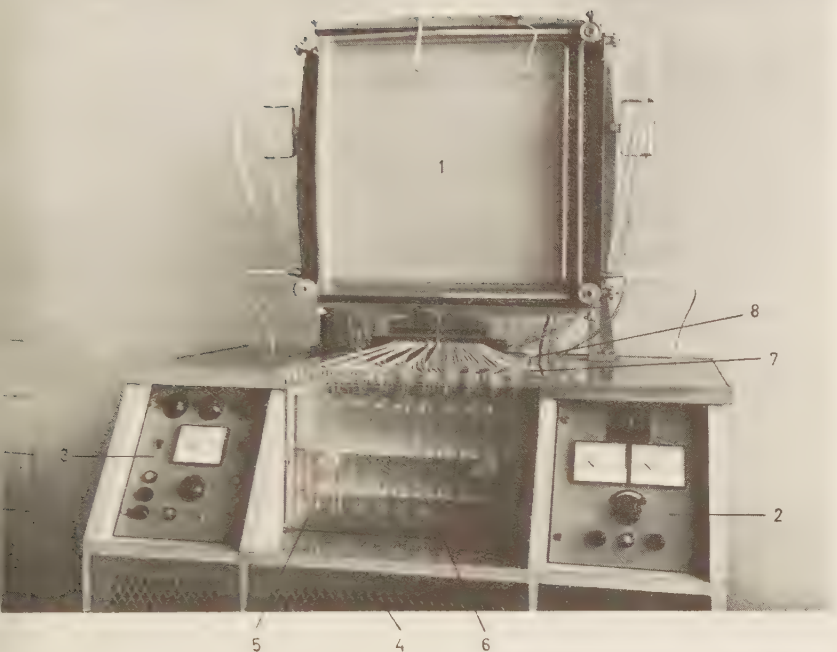


Abb. 28

Gesamtansicht der Trennapparatur mit vertikal angeordneter Trennkammer

1 = Trennkammer; 2 = Hochspannungsgleichrichter;
3 = Gleichrichter für Peltier-Batterien; 4 = Puffer-
vorratsgefäße; 5 = Kühlkammer; 6 = Reagenzglasgestell;
7 = Substanzbehälter; 8 = Dosierpumpe für die Zuführung
der zu trennenden Substanzgemische

Auf dem mit Resopal verkleideten Unterbau, der die elektrischen und elektronischen Einrichtungen, wie Hochspannungsgleichrichter (2) (für die Versorgung der Trennkammer) und Gleichrichter (3) (für die Speisung der Peltier-Batterien) aufnimmt, ist in vertikaler Lage die Trennkammer (1) aufgebaut. Im Mittelteil des Unterbaues befinden sich unten

die Puffervorratsgefäße (4) für die Elektrodenpülung und die Trennkammer mit den erforderlichen Pumpvorrichtungen. In einer ebenfalls durch Peltier-Batterien gekühlten Plexiglaskammer (5) ist das Reagenzglasgestell (6) zur Aufnahme von 50 Auffanggläschen untergebracht, so daß die aufgefangenen Fraktionen ebenso wie das zu trennende Substanzgemisch (7) während der Dauer des Trennversuchs auf einer gewünschten tiefen Temperatur gehalten werden kann. An den beiden Schaltpulten sind neben den Einstellknöpfen an Zeigerinstrumenten die herrschende Spannung, Stromstärke und die Temperaturverhältnisse innerhalb der Trennkammer abzulesen.

3. Methodische Einzelheiten

Da die äußeren Dimensionen der Trennkammer, sowie ihr prinzipieller Aufbau der im Abschnitt I beschriebenen entspricht, gilt für die Konstanz der Leitfähigkeit und des pH-Wertes, die Konstanz des elektrischen Feldes, die Gleichförmigkeit der Pufferströmung, sowie für die Einflüsse durch die Oberflächenbeschaffenheit der Glasplatten im wesentlichen das bereits im ersten Teil der Arbeit Ausgeführte.

Zur Ermittlung der Temperaturkonstanz innerhalb des Trennraumes mußten allerdings neue Messungen durchgeführt werden (vergl. dazu Teil I, 2c). Diese Messungen ergaben den in Abb. 29 schematisch dargestellten Temperaturverlauf im Pufferfilm in der vertikal gestellten, durch Peltier-Batterien gekühlten Trennkammer. Wie ersichtlich,

ist der Temperaturverlauf in Richtung der Kraftlinien des elektrischen Feldes sehr konstant. Die maximalen Abweichungen belaufen sich über die gesamte Trennfläche auf $0,2^{\circ}\text{C}$. Damit ist eine ausreichende Gewähr gegeben, Störungen durch Thermokonvektion zu vermeiden.

Für die theoretische Berechnung der erforderlichen Kälteleistung der Peltier-Batterien zur Abführung der durch den Stromtransport gebildeten Joule'schen Wärme gilt in diesem Fall folgende Gleichung:

$$Q = \frac{F (t_1 - t_2)}{\frac{1}{\alpha_1} + \frac{d}{\lambda}} \quad (26)$$

Q = abgeführte Wärmemenge (Kcal/Std.); F = Oberfläche der Glasplatte (m^2); t_1 = Temperatur des Pufferfilms ($^{\circ}\text{C}$); t_2 = Temperatur der Kupferplatten ($^{\circ}\text{C}$); α_1 = Wärmeübergangszahl für ruhendes Wasser ($\text{Kcal}/\text{m}^2 \cdot \text{h} \cdot ^{\circ}\text{C}$); d = Dicke der Glasplatte (m); λ = Wärmeleitzahl des Glases ($\text{Kcal}/\text{m}^2 \cdot \text{h} \cdot ^{\circ}\text{C}$).

Bei den gegebenen Verhältnissen in der beschriebenen Trennkammer mit Peltierkühlung ergeben sich folgende praktischen Werte für die einzelnen Faktoren der Gleichung:

$$F = 0,25 \text{ m}^2; \quad \alpha_1 = 500; \quad d = 0,003; \quad \lambda = 0,65$$

Aus diesen Angaben ergibt sich für:

$$t_1 - t_2 = \frac{Q}{42}; \quad t_1 - t_2 = \frac{W}{49} \quad (27)$$

Für den praktischen Fall z.B. bei einer Belastung der Trennkammer von 500 W, entsprechend 430 Kcal, beträgt $t_1 - t_2 = 10,2^{\circ}\text{C}$.

Auf Grund der Leistungsangaben der verwendeten

Peltier-Batterien beträgt die Kälteleistung in Watt pro Batterie bei einer Temperatur der Warmseite von $+10^{\circ}$ (Kühlung mit Wasserleitungswasser) und einer Temperatur der Kaltseite von $+2^{\circ}$ etwa 18 Watt. Im vorliegenden Beispiel müßte also die Pufferfilmtemperatur auf knapp über $+12^{\circ}\text{C}$ gehalten werden können. Diese theoretischen Berechnungen stimmten ausgezeichnet mit den praktisch gemessenen Daten während eines Trennversuches überein (vergl. Abb. 29).

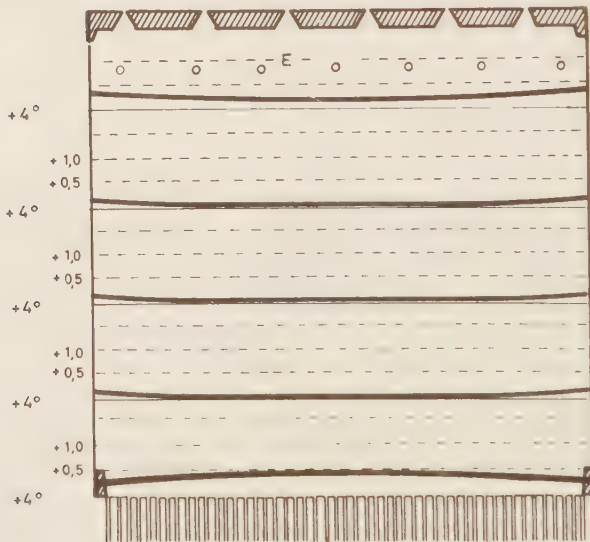


Abb. 29

Temperaturverteilung innerhalb des Pufferfilms
während eines Versuches

(Kammer mit "Peltier-Kühlung")

Trispuffer pH 6,9; 2000 Volt; 150 mA.
Der Abstand der senkrecht zur Ordinate verlaufenden gestrichelten Netzklinien entspricht einer Temperaturdifferenz von $0,5^{\circ}\text{C}$. (Vergl. dazu Abb. 11)

Es liegt im Wesen der Peltier-Batterien, daß ihre Kälteleistung bei niedrigen Temperaturen der Kaltseite sehr stark abfällt. Aus dieser Tatsache ergibt sich, daß die auf die Kupferplatte aufgelegte Glasplatte möglichst dünn gehalten werden soll, um eine günstige Wärmeleitung zu ermöglichen. Noch besser erscheint es, statt Glas eine dünne Kunststoffolie als isolierende Schicht zwischen Kupferplatte und Trennkammer zu legen. Wegen der Gefahr des elektrischen Durchschlages durch dünne Kunststofffolien auf die geerdete Kupferplatte haben wir diesen Weg jedoch aus Sicherheitsgründen nicht beschritten. In Abb. 30 sind die gefundenen Pufferfilmtemperaturen in Abhängigkeit von der angelegten Wattleistung an die Trennkammer angeführt.

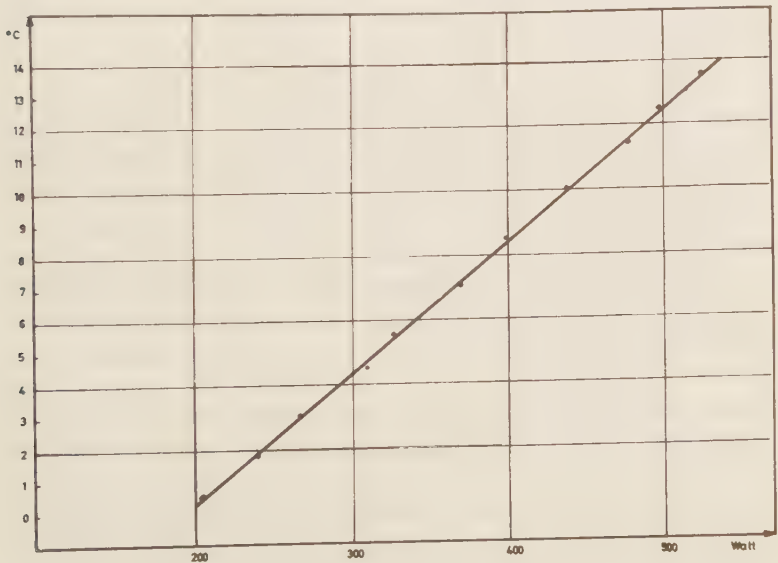


Abb. 30

Abhängigkeit der Pufferfilmtemperatur von der angelegten Leistung in Watt

4. Versuche zur Trennung von Zellen und Zellorganellen

a) Allgemeine Vorbemerkungen

Die Aufarbeitung von Zellen und Zellfragmenten erfordert besonders schonende und sehr definierte Versuchsbedingungen. Aus den bisher in der Literatur bekannt gewordenen Arbeiten und den beschriebenen Versuchsergebnissen wird es deutlich, daß zur Beherrschung der Milieubedingungen viele orientierende Versuche notwendig sind. (Vergl. dazu z.B. Lang und Siebert⁶³). Generelle und allgemein gültige Angaben sind nicht zu machen, da die günstigsten Bedingungen in jedem Fall dem individuellen Verhalten der verschiedenen Zellarten bzw. Zellbestandteile anzupassen sind.

So muß man z.B. im Vergleich zu tierischen Zellen bei pflanzlichen Zellen größere Kräfte aufwenden, um diese zu homogenisieren, da die starken Zellmembranen aus Zellulose und Pektinen besonders widerstandsfähig sind. Dadurch können leicht die zarten, zytoplasmatischen Strukturen wie Mitochondrien, Mikrosomen, Sphaerosomen und Lysosomen geschädigt werden. (Vergl. z.B. Paech und Tracey⁶⁴). Beim Aufbrechen der Zelle werden aber auch die etwas widerstandsfähigeren Strukturelemente wie Chloroplasten und Kerne leicht mechanisch geschädigt.

Außer den mechanischen Kräften können auch osmotische Einflüsse, sowie pH-Unterschiede des Suspensionsmediums zur Schädigung führen.

Am geeignetsten ist ein pH-Bereich um den Neutralpunkt. Mitochondrien z.B. können schon bei einem pH-Wert unterhalb 6,0 ihre funktionelle Struktur verlieren. (Zusatz von Magnesium-Ionen oder Citrat-Ionen soll die Stabilität begünstigen (Paech⁶⁴)).

Zur Einstellung der geeigneten osmotischen Verhältnisse dienen in der Regel 0,25 bis 0,88 m Rohrzuckerlösungen (analytisch rein). Bei der Aufarbeitung tierischer Zellfragmente sind dabei meist hypertonische Lösungen (0,88 m) vorzuziehen. Bei pflanzlichen Objekten können dagegen schon in 0,5 m Rohrzuckerlösung Schädigungen bzw. Artefakte auftreten.

Die beste Beurteilung für die richtige Auswahl der zur Isolierung einer bestimmten Zell- oder Zellfraktion gegebenen Bedingungen ist die Betrachtung des morphologischen Verhaltens im Licht- oder Elektronenmikroskop. Verklumpungen sind stets Zeichen von Schädigungen.

Im allgemeinen sollen alle Arbeitsgänge möglichst schnell und bei niederen Temperaturen unterhalb $+5^{\circ}\text{C}$ ausgeführt werden. Schon kurzfristige Erwärmung kann komplizierte Systeme (z.B. die Phosphorylierung) irreversibel inaktivieren (L a n g)⁶³⁾. Aufarbeitungs- und Trennmethode werden daher umso erfolgreicher sein, je näher sie sich diesen Voraussetzungen anpassen.

Fast alle in der Literatur beschriebenen Homogenisierungsmethoden (H o g e b o o m u. Mitarb.)⁶⁵⁾ streben eine möglichst vollständige und schonende Zerkleinerung zum Zwecke der nachfolgenden "fraktionierten" oder "differenzierten" Zentrifugation (P i c k e l s)⁶⁶⁾ an.

Eine Trennung der einzelnen Komponenten erfolgt hierbei durch das unterschiedliche Sedimentationsverhalten der verschieden schweren Teilchen, entweder bei gleichbleibender Zentrifugalgeschwindigkeit (g -Zahl) in einem Dichtegradienten oder bei gleichbleibender Dichte mit variierten Beschleunigungskräften. Diese Verfahren setzen, wenn möglichst reine Fraktionen erhalten werden sollen, eine besonders gleichmäßige und schonende Aufarbeitung der Homogenate voraus.

Es existieren bisher noch keine Erfahrungen über die Vorbehandlung von Zellhomogenaten, wenn eine elektrophoretische Trennung beabsichtigt ist.

Bei dieser Methode spielen im Gegensatz zur Zentrifugation weniger die Größen- und Dichteverhältnisse der Zellelemente für ihre Trennung die entscheidende Rolle. Es sind hier die elektrophoretischen Beweglichkeitsunterschiede als Folge der unterschiedlichen Oberflächenladung der Teilchen gegenüber dem Puffermilieu, (für die einzelnen Zellelemente eine charakteristische Größe) die zu ihrer Trennung genutzt werden.

Zur Frage der günstigsten Versuchsbedingungen bei der Aufarbeitung und Trennung ganzer Zellen können wir uns dagegen zum Teil auf Literaturangaben im Zusammenhang mit der diskontinuierlichen Zellelektrophorese⁵⁸⁻⁶³⁾ beziehen.

Die prinzipielle Darstellung von Zellen aus biologischem Material ist dann besonders einfach, wenn diese nicht in einem Organ oder Gewebe gebunden sind. Im einfachsten Fall genügt dabei meist die "Schrägsenkung" zur Abtrennung, z.B. der Blutzellen vom Plasma. Die Erfahrungen zur Isolierung von Zellen aus Geweben sind dagegen noch gering. In jedem Fall muß aber darauf geachtet werden, daß die Oberflächenladungen der Teilchen nicht verändert werden, was z.B. durch Adsorption von Hämoglobin aus bereits hämolysierten Zellen (A b r a m s o n u. Mitarb.)⁵⁷⁾ oder von komplexbildenden Elektrolytionen möglich ist.

Durch Adsorption von Hämoglobin wird z.B. die Beweglichkeit der Erythrocyten so verändert, daß der isoelektrische Punkt höher liegt, als es der eigentlichen Oberflächenladung der Zellen entsprechen würde⁵⁷⁾. P i p e r und R u h e n s t r o t h - B a u e r⁶⁷⁾ haben die Proteinadsorption eingehend studiert. Sie fanden, daß sie vom pH, der Ionenstärke und der Art der Proteine abhängt. Eine Erniedrigung der Ionenstärke begünstigt die Adsorption. Bei einer Ionenstärke

von 0,15 findet jedoch eine geringe Adsorption nur zwischen pH 2 und pH 4 statt. Daraus ergibt sich, daß es zweckmäßig ist, bei Elektrophoreseversuchen mit möglichst hohen Elektrolytionenkonzentrationen zu arbeiten, was wiederum eine besonders wirksame Kühlung voraussetzt.

Zur Vermeidung von Komplexbildung gaben M o o r und L y a n s 68) bei Elektrophoreseversuchen zur Trennung von Milchpartikelchen dem Puffer geringe Mengen V e r s e n oder EDTA (Äthylen-diamino-tetraessigsäure) bei.

Für die Vorbehandlung von Zellen zum Zwecke der Elektrophorese hat sich auch dreimaliges Waschen mit physiologischer Kochsalzlösung bewährt; es entfernt von den Zellen meist alles elektrophoretisch störende, adsorbierte Protein (R u h e n s t r o t h - B a u e r u. Mitarb.)⁵⁸⁾. Die Frage nach der Art der negativen Gruppen, die die Wanderung der Zellen im elektrischen Feld bedingt, wurde von F u r c h g o t t und P o n d e r ⁶⁹⁾ untersucht. Danach soll es sich um stark saure Phosphorsäuregruppen von Lipoiden handeln, die die negative Ladung an der Zelloberfläche im wesentlichen hervorrufen.

Bei den erwähnten Versuchen zur Ermittlung der elektrophoretischen Beweglichkeit von Zellen in kleinen diskontinuierlich arbeitenden Kammeranordnungen wurde meist mit isotonisch eingestelltem Phosphatpuffer oder Veronalpuffer gearbeitet. Zur Variation der Ionenstärke diente eine 5,4 %ige Glukoselösung. Die Verwendung von Sorbit anstelle von Glukose konnte in verschiedenen Versuchen die Streuung der Meßwerte vermindern (R u h e n s t r o t h - B a u e r u. Mitarb.)⁵⁸⁾

Versuche zur Bestimmung der Beweglichkeit von Blutzellen ergaben bei verschiedenen Autoren unterschiedliche Ergebnisse. F r i t z e 70) fand bei einer Erythrozytenbeweglichkeit von etwa $14-16 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{V}$.

folgende Werte: Lymphozyten 11,5, Granulozyten 10,5, Monozyten 9,0. B a z i n und R o b i n e a u x ⁷¹⁾ fanden bei einer Erythrozytenbeweglichkeit von 5,9 - 6 für die Lymphozyten 4,8, für die Granulozyten 3,3 - 4,3 10^{-5} cm²/Volt-sec. Die Unterschiede der Befunde beider Autoren sind verhältnismäßig hoch; sie zeigen aber eine gewisse Übereinstimmung in Bezug auf die Beweglichkeitsunterschiede der einzelnen Zellen, die abfallend von den Erythrozyten über die Lymphozyten zu den Granulozyten verläuft.

B a z i n und R o b i n e a u x ⁷²⁾ untersuchten auch die Zellen von verschiedenen Leukämieformen: Bei akuten Leukämien wurden für die entarteten Zellen höhere Werte gemessen als bei normalen Leukozyten. Auf die Möglichkeit der Abtrennung von Karzinom-Zellen von gesunden Zellen hat auch R u h e n s t r o t h - B a u e r ⁵⁸⁾ hingewiesen.

Bei den im folgenden beschriebenen Versuchsbeispielen zur präparativen kontinuierlichen Trennung von Zellen und Zellfragmenten hat sich als Puffermilieu in den meisten Fällen ein Trispuffer von etwa pH 7,0 und isotonischer Einstellung mit Sorbit oder Rohrzucker am besten bewährt. Feldstärken bis zu 50 V/cm konnten angewendet werden, wenn die Temperatur des Pufferfilms genügend tief gehalten wurde.

b) Die Trennung der Zellfragmente aus grünem Spinat

20 g frischer grüner Spinat wurde mit 60 ml 0,25 m Rohrzuckerlösung (pH 6,5) 1/2 Minute unter Eiskühlung im Homogenisator (Fa. Bühler, Tübingen) hochtourig homogenisiert.

Durch Zentrifugation während 5 Minuten bei 200 g wurden grobe Bestandteile wie ganze Zellen, Zellverbände und Zellwände abgetrennt. Der Überstand wurde mit dem gleichen Tris-Puffer, der auch bei der elektrophoretischen Trennung verwendet wurde, (8,725 g Tris in 0,5 l H₂O mit 2 m

Zitronensäure auf pH 6,5 eingestellt; 1 Teil Puffer + 5 Teile 0,25 m Rohrzuckerlösung) im Verhältnis 1:1 verdünnt.

Die Durchführung der Elektrophorese erfolgte bei 1880 Volt und 150 mA; das entspricht einer Feldstärke von etwa 37 Volt/cm. Die Temperatur in der Trennkammer betrug +5°C. Die in der Abb. 31 wiedergegebenen Verteilungskurven wurden durch Extinktionsmessung der einzelnen Fraktionen in den Auffanggläschen bei 260 und 430 m μ erhalten.

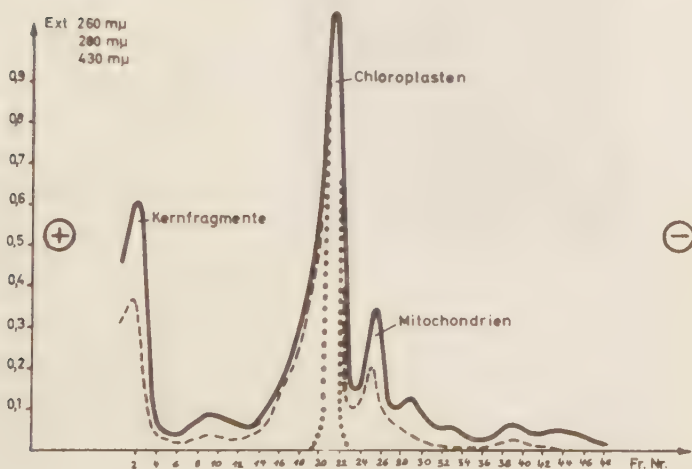


Abb. 31

Auftrennung der Zellbestandteile aus grünem Spinat

Trispuffer pH 6,5; (8,725 g Tris in 0,5 l H₂O gelöst, mit 2 m Zitronensäure auf pH 6,5 eingestellt; 1 Teil Puffer + 5 Teile 0,25 m Rohrzuckerlösung)

$\chi = 0,00165 \Omega^{-1} \text{ cm}^{-1}$; 1880 Volt; 150 mA; Dosierung = 2 ml/Std.; Durchlaufgeschwindigkeit des Pufferfilms = 50 cm/Std.

Die Hauptfraktion enthielt, wie schon die grüne Farbe und die hohe Extinktion bei $430\text{ m}\mu$ erkennen läßt, im wesentlichen die Chloroplasten. Im Mikroskop betrachtet, war die Fraktion sehr einheitlich und frei von anderen Zellbestandteilen (Abb. 32).



Abb. 32

Farbfoto der mikroskopisch
Aufnahme der abgetrennten
Chloroplasten aus Spinat

Die Chloroplasten erscheinen kaum deformiert. Man erkennt in der Originalaufnahme deutlich die lamellenartigen Strukturen der Grana, obwohl in diesem Fall keine Anfärbung der Präparate erfolgte.

In der am weitesten anodisch wandernden Fraktion wurden fast ausschließlich durch Zentrifugation nicht abgetrennte Zellkerne und Zellkernfragmente nachgewiesen. Abb. 33 zeigt die mikroskopische Aufnahme des Sedimentes. Das Präparat wurde mit H ä m a t o x y l i n angefarbt. Man erkennt deutlich einen Zellkern und im übrigen Kernfragmente.



Abb. 33

Kern und Kernfragmente nach
der Abtrennung aus Spinat-
homogenat

(Mikroskopische Vergrößerung,
Anfärbung mit Hämatoxylin)

Wie zu erwarten war, sind die Kerne durch verhältnismäßig intensive Homogenisierung zum großen Teil zerstört worden.

Im Gesamtüberblick bei einer schwächeren Vergrößerung wiederholen sich diese Strukturen, ohne daß weitere Nebenbestandteile zu erkennen waren. Es ist interessant, daß in der Elektrophorese die intakten Kerne und die deformierten Kernfragmente mit der gleichen elektrophoretischen Beweglichkeit gewandert sind.

In der kleineren, am wenigsten weit anodisch wandernden Fraktion waren Mitochondrien anzunehmen, da nur hier das typische Adsorptionsspektrum von DPNH mit einem Maximum bei $340 \text{ m}\mu$ festgestellt wurde.

Abb. 34 zeigt einen Versuch zur Darstellung der Mitochondrien nach Anfärbung mit Janusgrün. Da die Mitochondrien bekanntlich sehr empfindlich sind, vor allem gegen pH-Unterschiede, osmotische und mechanische Einflüsse, wurde diese Fraktion nicht angereichert, so daß

eine verhältnismäßig hohe Verdünnung vorlag.



Abb. 34
Mitochondrienfraktion nach
Anfärbung mit Janusgrün
(Mikroskopische Aufnahme)

c) Versuch zur Trennung von
"Mitochondrien" und "Mikrosomen"
aus Rattenleberhomogenat.

Eine 3 Wochen alte Ratte wurde durch Decapitierung getötet, die sofort entnommene Leber gekühlt und durch ein Sieb von 1 mm Maschenweite gepreßt, wobei sie von der Hauptmenge des Bindegewebes befreit wurde. 2 g des Gewebestreues wurden dann mit 20 ml, 0,25 molarer Rohrzuckerlösung versetzt und im Homogenisator nach Potter und Elvehjem⁷³⁾ 5 Minuten bei 1100 Umdrehungen pro Minute homogenisiert. 10 ccm des Homogenats wurden 10 Minuten lang bei 600 g zentrifugiert und der Überstand mit 20 ml Trispuffer pH 7,4 verdünnt. Die elektrophoretische Trennung erfolgte gleichfalls in Trispuffer pH 7,4. Bei einer Durchlaufgeschwindigkeit von etwa 45 cm/Std., bei einer Klemmenspannung von 2560 Volt (150 mA) wurden innerhalb von 3 Stunden 15 ml der Aufschlammung getrennt.

Zuführung d. Trennlösung ○ ○ ○ ● ○

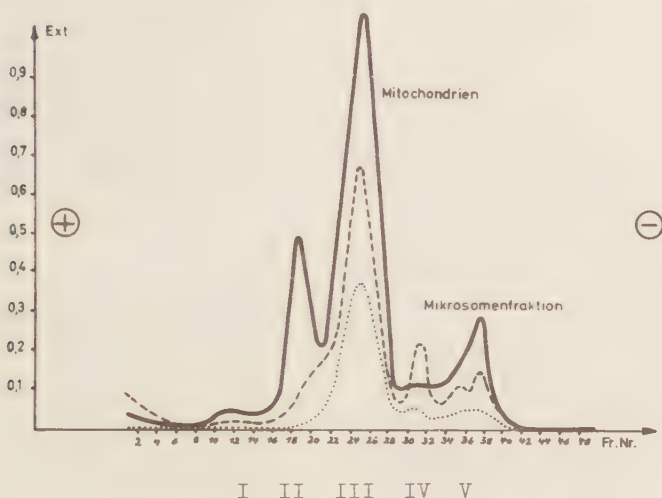


Abb. 35

Auftrennung eines Rattenleberhomogenats

Trispuffer pH 7,4 (bereitet wie im Versuch der Abb. 28 beschrieben) $\kappa = 0,00117 \Omega^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; 2560 Volt; 150 mA; Dosierung = 5 ml Homogenat/Std.; Durchlaufgeschwindigkeit des Pufferfilmes = 45 cm/Std.

Die Verteilung der einzelnen Fraktionen in den Auffanggläsern erfolgte durch Extinktionsmessung bei 260, 280 und 330 $m\mu$. Das Ergebnis ist in Abb. 35 wiedergegeben. Auffällig ist die hohe Extinktion bei 260 $m\mu$ in der mit II bezeichneten Fraktion, was auf das Vorhandensein von RNS und DNS schließen läßt. Die kleine, mit III bezeichnete Fraktion weist dagegen eine besonders scharfe und verhältnismäßig hohe Extinktion bei 280 $m\mu$ auf. Die drei Gläser mit den höchsten Extinktionswerten innerhalb der einzelnen Fraktionen wurden unter Auslassung der Zwischenbereiche vereinigt und schließlich eine Stunde lang bei 80.000 g in der Ultrazentrifuge (Beckman/Spinco Mod.L)

geschleudert. Nur die Fraktionen III, IV und V ergaben sichtbare Sedimente, die im Elektronenmikroskop auf ihre Zusammensetzung untersucht wurden. Zwei Techniken kamen zur Anwendung:

1. das sogenannte "Negativ staining Verfahren" (B r e n n e r und H o r n e)⁷⁴⁾
2. die Einbettung der osmiumfixierten Sedimente in Eponharz und elektronenmikroskopische Aufnahme der Schnitte (vergl. z.B. ⁷⁵⁾).

Danach unterscheiden sich die einzelnen Fraktionen sehr stark voneinander. Die einzelnen Strukturelemente innerhalb einer Fraktion zeigten eine gute Homogenität.

In den folgenden Abbildungen sind die Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Aufnahmen dargestellt.

Abb. 36 zeigt die Aufnahme eines Schnittes der eingebetteten Sedimente aus Fraktion III. Wie zu ersehen ist, fanden sich in dieser Fraktion die Mitochondrien des Hologenats in guter Reinheit.

Die Aufnahmen der Schnitte aus der Fraktion IV mit der verhältnismäßig hohen Adsorption bei 240 m μ ist ebenfalls bestechend in der Homogenität. Die Strukturen zeigen wohl Teile des intrazellulären Membransystems (Abb. 37).

Die in ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit langsamste Fraktion V zeigt dagegen granuläre Gebilde. Daß es sich dabei um Ribosomen handeln könnte, muß mit aller Vorsicht erwogen werden (Abb. 38).

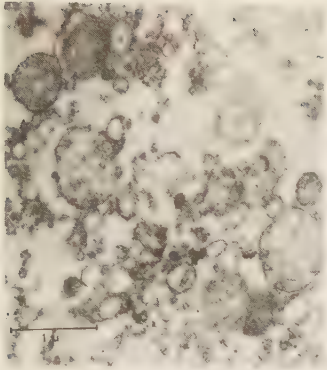
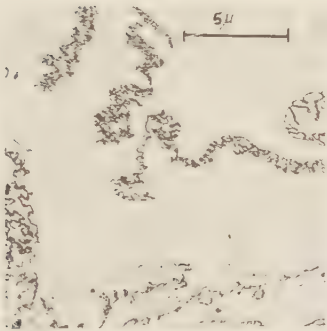


Abb. 36 Fraktion III



Elektronenmikroskopische Auf-
nahmen der Sedimente aus Frak-
tion III - V (Vergl. Abb. 35)
osmiumfixiert, in Eponharz einge-
bettet

Abb. 37 Fraktion IV

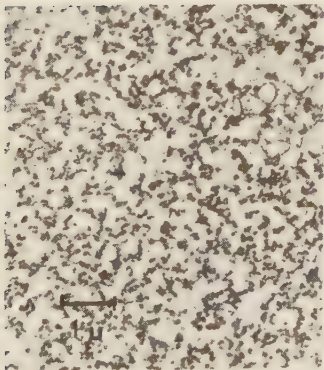


Abb. 38 Fraktion V

d) Auftrennung einer Mischung von Human- und Kaninchenerythrocysten

Abb. 39 zeigt die photographische Wiedergabe der Wanderungswege während der Trennung einer Mischung von Kaninchen- und Humanerythrocyten.

Der Versuch hat natürlich keine praktische Bedeutung; er zeigt aber deutlich, wie scharf die Zonen während der Trennung erhalten werden können und wie charakteristisch sich zwei gleiche Zellarten verschiedener Gattungen unterscheiden. (Versuchsbedingungen siehe Abbildungsbeschriftung).

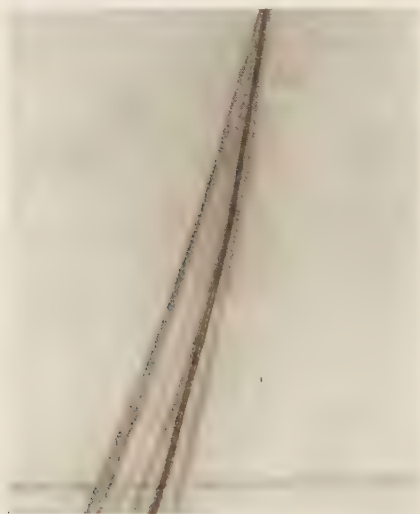


Abb. 39

Trennung einer Mischung von Kaninchen- und Humanerythrocyten

Photographie der Wanderungswege; Trispuffer pH 5,3 (mit Sorbit isotonisch eingestellt)
 $\kappa = 0,00131 \Omega \cdot \text{cm}$; Feldstärke = 55 Volt/cm

e) Elektrophoretische Auftrennung einer Leukozytenanreicherung

Aus 100 ml Humanblut wurde durch Schrägsenkung eine stark angereicherte Leukozytenaufschlammung gewonnen. 1 ml des

Sedimentes, das durch beigemengte Erythrozyten noch leicht rosa gefärbt erschien, wurde mit 5 ml Tris-puffer pH 6,9 (mit Rohrzucker isotonisch eingestellt) verdünnt. Die Trennung erfolgte bei 2450 Volt und 160 mA bei einer Pufferfilmtemperatur von $+8^{\circ}\text{C}$. 3 ml der Aufschlämmung wurden stündlich der Trennkammer zugeführt. Die Verteilung der getrennten Komponenten durch Trübungsmessung bei $400\text{ m}\mu$ ist in Abb. 40 wiedergegeben.

Zuführung d. Trennlösung

○

○

●

○

○

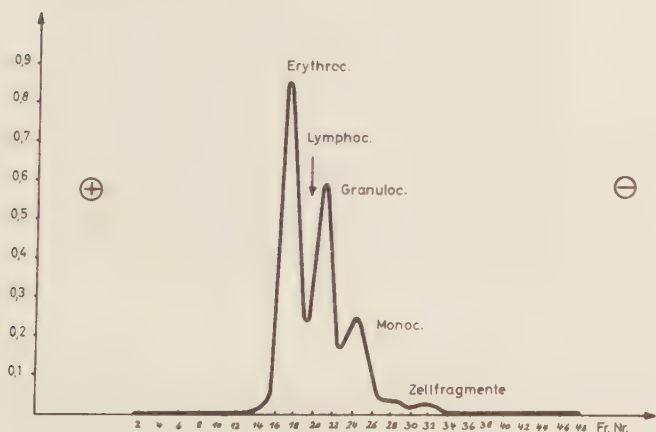


Abb. 40

Versuch zur Trennung von Blutzellen (Humanblut)

Trispuffer pH 6,9 (3,7 g Tris pro 0,5 l H_2O , mit 2 m Zitronensäure auf pH 6,9 eingestellt und mit 0,25 m $^{-1}$.cm $^{-1}$ Rohrzuckerlösung auf 3 l aufgefüllt). $\kappa = 0,00125\ \Omega^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$
2450 Volt; 160 mA

Von den Sedimenten der einzelnen Fraktionen wurden Ausstriche angefertigt. Die mikroskopischen Aufnahmen nach ihrer Anfärbung (P a p p e n h e i m)⁷⁰⁾ zeigen folgende Abbildungen.

Es gelang die vollkommene Abtrennung der noch vorhandenen Erythrozyten (Abb. 41). Wie die Aufnahme zeigt, ist die morphologische Struktur der Zellen noch vollkommen erhalten geblieben und die Fraktion war frei von jeglichen anderen Beimengungen.

Die Reindarstellung der Lymphozyten gelang dagegen nicht regelmäßig. Die Aufnahme in Abb. 42 zeigt eine Mischung von Lymphozyten mit Erythrozyten aus dem Bereich des Minimums der Verteilungskurve zwischen Erythrozyten und Granulozytenfraktion. (Gläschen 19 aus dem Versuch der Abb. 40).

Die nächste Fraktion mit dem Maximum bei Gläschen 20 (Abb. 40) enthielt fast ausschließlich Granulozyten. Die mikroskopische Aufnahme der gefärbten Ausstriche zeigt jedoch in diesem Fall eine leichte Schädigung durch Quellung der empfindlichen Granulozyten (vgl. Abb. 43).

In der Fraktion mit dem Maximum bei Gläschen 24 fanden sich in der Hauptsache monozytäre Formen. Auch hier scheint eine leichte Schädigung durch Quellung eingetreten zu sein (Abb. 44).

Die beiden sehr langsam wandernden Fraktionen (Abb. 40) mit dem Maximum bei Gläschen 28 und 32 enthielten zerstörte Zellbestandteile.

Lichtmikroskopische Aufnahmen
der gefärbten Ausstriche aus
Versuch der Abb. 40 (Anfärbung
nach P a p p e n h e i m)⁷⁶⁾

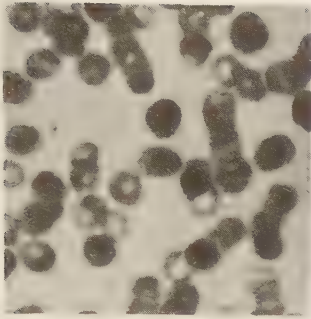


Abb. 41
Erythrozytenfraktion

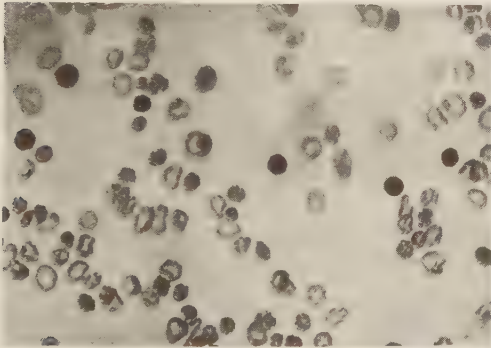


Abb. 42
Mischung von Erythrozyten und
Lymphozyten (aus Gläschen 19,
Versuch der Abb. 40)



Abb. 43
Granulozyten (Gläschen 19-21;
Abb. 40)



Abb. 44

Monozytäre Formen (Gläschen 2,
Abb. 40)

f) Isolierung von Tumorzellen
des Walker-Ascites-Tumors der
Ratte

Die Möglichkeit der Abtrennung von Tumorzellen aus einer Mischung von unverändertem Zellmaterial zeigt das vorliegende Versuchsbeispiel. Das Material für die Versuche verdanke ich Herrn W r b a vom Pathologischen Institut der Univ. München.

Unter den gleichen Versuchsbedingungen wie im vorstehenden Trennversuch wurde das im Verhältnis 1:2 verdünnte Asciteszellmaterial für die Trennung eingesetzt. 5 ml der Aufschlammung wurden der Trennkammer pro Stunde zugeführt. Die Verteilung der Fraktionen durch Frühungsmessung bei 400 m μ zeigt Abb. 45.

Die Abtrennung der Erythrozyten gelang auch in diesem Fall vollkommen. Die Auftrennung der Leukozyten war dagegen weniger scharf. In dem am weitesten wandernden Teil der Leukozytenfraktion - und zwar in Gläschen 19 - fand sich, wie an Ausstrichen festgestellt wurde, die größte

Anreicherung von Tumorzellen. Über 90 % der Zellbestandteile waren Krebszellen. In den daneben liegenden Gläsern 18 und 20 waren dagegen nur noch 20 % Tumorzellen neben Erythrozyten bzw. Leukozyten nachzuweisen, während alle anderen Fraktionen von ihnen frei waren.

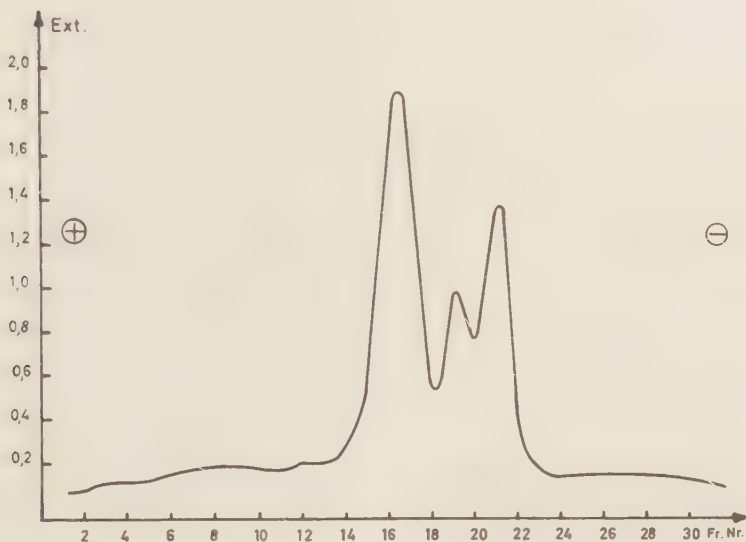


Abb. 45

Versuch zur Abtrennung der Tumorzellen des Walker-Ascites-Tumors der Ratte.

Trispuffer pH 6,9 (wie im Versuch der Abb. 37)
 $\kappa = 0,00125 \Omega^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; 2450 Volt; 160 mA.

Abb. 46 zeigt die mikroskopische Aufnahme der Mischung des Ascites-Zellmaterial, wie es für die Trennung verwendet wurde. Man erkennt neben den in der Hauptsache vorhandenen Erythrozyten die verschiedenen Formen der Leukozyten und vereinzelt schwach angefärbt einige Tumorzellen.

Wie aus Abb. 47 eindeutig zu ersehen ist, waren auch in diesem Trennversuch die Erythrozyten in der am raschesten anodisch wandernden Fraktion vollkommen einheitlich und frei von Tumorzellen. Eine mikroskopische Aufnahme der aus Auffanggläschen 19 erhaltenen Ausstriche der Tumorzellen-Fraktion zeigt die Abb. 48 in einer Übersichtsaufnahme und einer stärkeren Vergrößerung in Abb. 49.

Alle getrennten Fraktionen wurden Versuchstieren implantiert. Nur die angereicherte Tumorzell-Fraktion führte zur Entwicklung eines Krebses. Das Wachstum des Krebses war nur wenig verzögert gegenüber demjenigen das an Kontrolltieren festgestellt wurde, die mit ungetrenntem Ascites-Tumormaterial infiziert worden waren. Ob diese Verzögerung des Wachstums beim Implantieren elektrophoretisch getrennter Zellen auf eine teilweise Zellschädigung zurückzuführen ist, bleibt zu klären.



Lichtmikroskopische Aufnahmen
gefärbter Ausstriche von Zell-
fraktionen des Walker-Ascites-
Tumors

Abb. 46

Zur Trennung eingesetztes ursprüngliches Ascites-Zellmaterial

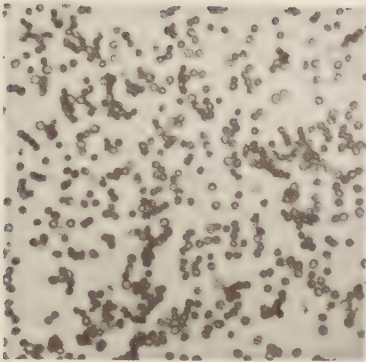


Abb. 47

Erythrozytenfraktion nach der
Trennung

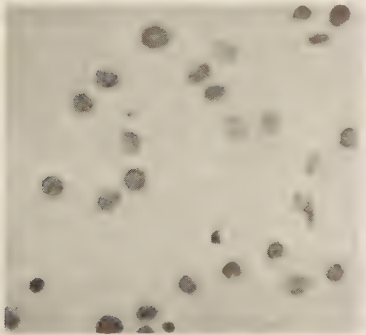


Abb. 48

Tumorzellenfraktion nach der
Trennung (Gläschen 20 des Ver-
suches aus Abb. 42)

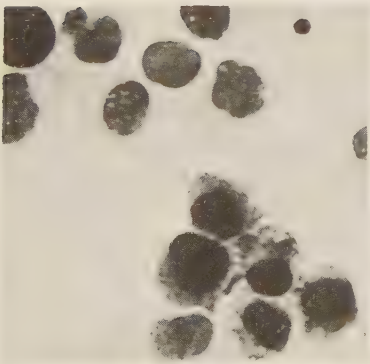


Abb. 49

Wie Abb. 48, stärker vergrößert

Nach diesem Versuch scheint es möglich zu sein, reine
Fraktionen von Tumorzellen darzustellen.

D i s k u s s i o n

Wie in der Einleitung bereits ausgeführt wurde, erfordert die Lösung wichtiger biologischer und biochemischer Probleme eine richtige Auswahl geeigneter Versuchsbedingungen oder in vielen Fällen die Entwicklung neuer Methoden, die sich zum Teil weit von den klassischen Verfahren der Chemie entfernen. Methoden dieser Art sind die c h r o m a t o g r a p h i s c h e n Verfahren (Adsorptions-, Verteilungs-, Ionenaustauschchromatographie), die e l e k t r o p h o r e t i s c h e n Methoden und die Methoden der U l t r a z e n t r i f u g a t i o n.

Während die chromatographischen Methoden zum größten Teil an niedermolekularen Substanzen entwickelt wurden und ihr Anwendungsbereich sich erst in jüngster Zeit auch auf höhermolekulare Stoffe wie Proteine ausgedehnt hat, sind die Methoden der Ultrazentrifugation ursprünglich für hochmolekulare Substanzen entwickelt worden und gestatten in neueren Entwicklungen (A r c h i b a l d ⁷⁷); T r a u t m a n ⁷⁸) wenigstens die analytische Erfassung auch niedermolekularer Stoffe.

Die E l e k t r o p h o r e s e ist eine Methode, bei der kleinste Ladungsunterschiede einzelner Stoffe für deren Trennung und analytische Erfassung genutzt werden. Sie ist daher grundsätzlich auf alle Substanzen anwendbar, die elektrische Ladungen tragen. Neben der allgemein anerkannten großen Bedeutung als analytische Methode in der "k l a s s i s c h e n" Elektrophorese nach T i s e l i u s oder in der P a p i e r e l e k t r o p h o r e s e ^{3,4}) erschließen sich in der präparativen Elektrophorese nach dem von uns gefundenen A b l e n k u n g s p r i n z i p ⁵) weitere neue Möglichkeiten.

Rückblickend auf die Entwicklung der kontinuierlichen A b l e n k u n g s e l e k t r o p h o r e s e , die 1949 an unserem Institut begann, ist es bezeichnend, daß das Anwendungsgebiet dieses Verfahrens innerhalb verhältnismäßig kurzer Zeit durch stetige apparative Verbesserungen erweitert werden konnte und somit neue Arbeitskreise erfasste, denen diese elegante neue Methode schwierige Trennprobleme besser und schneller zu lösen verhalf.

In den ersten Ausführungsformen, bei denen zur Stabilisierung der Pufferströmung ausschließlich Trägermedien verwendet wurden^{5,31,32}), war der Anwendungsbereich der kontinuierlichen Elektrophorese auf Stoffe beschränkt, die zu dem Trägermaterial keine wesentliche Affinität aufwiesen. Bei Makromolekülen oder bei Dispersionen von Materialien mit extremen Teilchengrößen wird eine Trennung unter Verwendung von Trägern ebenfalls unmöglich. Dies gilt übrigens in gleicher Weise für alle chromatographischen Trennmethoden, die ja gleichfalls auf poröse Trägermaterialien angewiesen sind. Alle diese Verfahren erlauben demnach zwar die Trennung oder analytische Erfassung niedermolekularer Verbindungen wie anorganische Ionen, Farbstoffe, Gerbstoffe (soweit diese nicht sehr stark adsorbiert werden), Aminosäuren, Peptide oder Vitamine, Hormone, Nucleotide u.a., aber auch zum großen Teil (vor allem in der kontinuierlichen Trägerelektrophorese) Proteine und Nukleinsäuren, also höhermolekulare Substanzen. Sie sind jedoch nicht anwendbar auf Makroproteine, Viren, Phagen, Linearproteine oder gar auf Zellen und deren Unterstrukturen.

Durch die vor etwa drei Jahren erstmals gelungene vollkommen trägerfreie Ausführung der kontinuierlichen Elektrophorese (H a n n i g)³⁴) in einem laminar und annähernd horizontal strömenden Flüssigkeitsfilm, konnte nicht nur

die Trennschärfe gegenüber der Trägererelektrophorese wesentlich verbessert, sondern auch wie in dieser Arbeit gezeigt wird, der Anwendungsbereich der Methode auf Linearproteine, Phagen oder Viren erweitert werden. Die Trennung von Zellen oder Zellorganellen gelang zwar in kurzen Versuchen ebenfalls in dieser Anordnung, jedoch erst durch den Übergang zu einer senkrechten Anordnung der Trennkammer, bei der die störende Sedimentation der Teilchen in die Richtung der Pufferströmung verlegt ist, konnten auch diese Trennungen in streng reproduzierbarer Weise auch in länger dauernden Versuchen durchgeführt werden. Die damit möglich gewordene präparative Isolierung von Zellen und Zellbestandteilen in der trägerfreien Elektrophorese bedeutet eine zusätzliche grundlegende und wichtige Erweiterung des Anwendungsbereiches dieser Methode und stellt wohl einen gewissen Abschluss in der Entwicklung kontinuierlicher Trennverfahren dar.

Die in vorliegender Arbeit beschriebenen Versuche zur Zell- und Zellfragmentisolierung sind mehrfach wiederholt worden. Die Ergebnisse waren nicht nur in Bezug auf gleiche quantitative Verteilung der Fraktionen, sondern auch hinsichtlich der Größe der Ablenkung im elektrischen Feld überraschend gut reproduzierbar. Das spricht nicht nur für die Methode, sondern ist vor allem ein bestechender Beweis für die Konstanz der elektrischen Ladungen, mit der die Natur diese Teilchen ausgestattet hat. Die Versuche sind mit Sicherheit noch weiter ausbaufähig; sie zeigen aber jetzt schon, daß in der trägerfreien Ablenkungselektrophorese neben den bisherigen Methoden zur Zellfraktionierung (fraktionierte Zentrifugation und Dichtegradienten-Zentrifugation) ein neues und unabhängiges Trennprinzip zur Verfügung steht, das die bisherigen Methoden auf das Beste ergänzt und allgemein für zytologische Probleme von großer Bedeutung zu werden verspricht.

Im Grunde genommen haben die Methoden der fraktionierten Zentrifugation und der freien Elektrophorese viel Gemeinsames. In beiden Fällen wandern die Teilchen unter der Einwirkung einer definierten und experimentell variierbaren Kraft in einem reibenden Medium. Die Unterschiede der Geschwindigkeit unter der Einwirkung dieser äußeren Kräfte werden genutzt, um die einzelnen Partikelchen zu trennen. In einem Falle ist es die Schwerkraft in künstlich geschaffenen verstärkten Schwerfeldern, die verschieden schwere Partikelchen unterschiedlich sedimentieren lassen. Im anderen Falle ist es die Kraft des elektrischen Feldes, die geladene Partikelchen zur Wanderung veranlasst. Zwei grundverschiedene physikalische Eigenschaften also werden für den gleichen Zweck, nämlich die Trennung und Reindarstellung unterschiedlicher Partikel genutzt. Schon aus dieser Tatsache ergibt sich die Möglichkeit, durch Kombination beider Verfahren schwierige Trennprobleme besser zu lösen. So kann bei gleichem Sedimentationsverhalten verschiedener Teilchen ihre unterschiedliche Ladung eine elektrophoretische Trennung ermöglichen. Umgekehrt gilt das gleiche, wenn Teilchen mit identischem elektrophoretischem Verhalten, aber unterschiedlichem Sedimentationsverhalten getrennt werden sollen.

Dank dieser Neuentwicklung reicht nunmehr der analytische und präparative Anwendungsbereich der kontinuierlichen Elektrophorese von niedermolekularen Stoffen angefangen über alle Zwischenstufen bis zu grobdispersen Teilchen. Damit können nicht nur Zellen und ihre Unterstrukturen erfaßt werden, die gleiche Methode erlaubt auch die Trennung und präparative Isolierung ihrer Fermentsysteme ohne Verluste der Aktivität oder die Reindarstellung anderer biologisch wichtiger Zellinhaltsstoffe.

Beim Vergleich der beiden nunmehr zur Verfügung stehenden Methoden zur präparativen Zellfraktionierung kann nicht der einen oder der anderen Methode ein besonderer Vorzug gegeben werden. Die Wahl des günstigsten Einsatzes des einen oder anderen Verfahrens wird sich immer nach der Problemstellung zu richten haben. Es ist eine Erfahrung, die auch durch die Ergebnisse vorliegender Arbeit bestätigt wird, daß die elektrophoretische Arbeitsweise eine schonendere Methode darstellt als die Zentrifugation, bei der durch die nötigen hohen Schwerefelder (bis 100 000 g) die Kräfte, die auf die empfindlichen Partikelchen wirken, größer sind als bei der Elektrophorese, wo bereits schwache elektrostatische Kräfte eine Wanderung verursachen. Die bei der Zentrifugation oft entstehenden irreversiblen Irritationen, wie morphologische Deformation und deren Begleiterscheinung, die Diffusion von Inhaltsstoffen der Organellen, konnten bisher bei der elektrophoretischen Trennung nicht beobachtet werden. In unseren Versuchen zur Fraktionierung von Zellen und Zellbestandteilen zeigte sich, daß selbst bei Feldstärken von 50 V/cm keine Schädigung beobachtet werden kann, wenn dafür gesorgt ist, daß die Milieubedingungen den zu trennenden Teilchen angepaßt und die Temperaturen entsprechend niedrig gewählt werden.

Die bisher elektrophoretisch dargestellten Präparationen zeigen meist eine auffallend gute Reinheit und Homogenität. Die Methode der fraktionierten Zentrifugation oder der Dichtegradientenzentrifugation scheint keine so reinen Fraktionen zu liefern. Partikelgleicher Art, bzw. gleichen Ursprungs, z.B. Teile der Zellwand, Kernfragmente oder Mitochondrien haben oft sehr unterschiedliche Größe und Gewicht und sedimentieren deshalb auch uneinheitlich⁶⁴⁾. Die elektrische Ladung gleichartiger Zellen oder Zellbestandteile ist dagegen nach bisherigen Erfahrungen weitgehend konstant und nur von geringer Streuung am Material gleicher

Individuen⁶²⁾. Darauf ist auch die besonders scharfe Trennung dieser Partikelchen im elektrischen Feld zurückzuführen, wie dies im Versuchsbeispiel der Abb. 39 vorliegender Arbeit deutlich veranschaulicht ist. Eine einwandfreie Trennung ist natürlich an die Voraussetzung gebunden, daß die elektrophoretischen Beweglichkeitsunterschiede verschiedener Partikelchen hinlänglich groß sind. Variation der Milieubedingungen wie z.B. die Änderung des pH-Wertes in für eine bessere Trennung günstigere Bereiche, ist bei den pH-empfindlichen Zellbestandteilen nicht so einfach durchzuführen wie beispielsweise bei gewöhnlichen Proteingemischen. Bei der Trennung von Zellen oder Zellorganellen wird man meist unter annähernd physiologischen Bedingungen arbeiten müssen.

Wie groß die Beweglichkeitsunterschiede sein müssen, um noch einwandfreie Trennungen zu erzielen, zeigt eine einfache Überlegung. Die Trennkammer mit 50 cm Breite hat 50 Entnahmestellen im Abstand von je 1 cm. Bei der guten Trennschärfe und der Ausbildung nur sehr schmaler Zonen ergibt sich im Durchschnitt, daß sich eine Fraktion auf zwei, maximal auf drei Sammelstellen verteilt. Dies bedeutet aber, daß die Beweglichkeitsunterschiede nur 4-6 % betragen müssen, um einwandfreie Trennungen zu erhalten.

Um alle Möglichkeiten des zur Verfügung stehenden neuen Trennverfahrens auf zytologische Problemstellungen voll auszuschöpfen, wird zunächst noch viel Arbeit zu leisten sein. In den zukünftigen Arbeiten soll ein exakter Vergleich zwischen den bisher angewendeten Methoden zur Zellfraktionierung und der trägerfreien kontinuierlichen Elektrophorese angestellt werden. Dabei sollen sich die Vergleiche nicht nur auf die Reinheit der isolierten Zellen und Zellbestandteile beschränken, sondern es sollen vergleichende Vitalitätsteste an biologischem Material ausgeführt werden. Sollte sich auch in der Zukunft ergeben, daß in der trägerfreien Elektrophorese bei den verschiedenen

Trennproblemen die Vitalität der Strukturen erhalten bleibt, so wie dies im Fall der Walker-Tumorzellen der Ratte gezeigt werden konnte (Versuchsbeispiel der Abb. 45), so ergeben sich für zytologische Fragestellungen neue Möglichkeiten. So kann z.B. die Isolierung und Anreicherung von Tumorzellen für medizinisch-diagnostische Zwecke ganz neue Aspekte bringen. Die Reinigung von Tumor- und Leukämiezellen erscheint deshalb auch ein wichtiges Vorhaben, weil wir uns von dieser Isolierung Aufschlüsse über das elektrische Ladungsmuster dieser Zellen und über ihre biochemischen Eigenschaften versprechen.

Die auf elektrophoretischem Wege erstmals mögliche Isolierung von Monozyten (Versuchsbeispiel der Abb. 40) wird eine neue Grundlage für die biochemische Untersuchung dieser in letzter Zeit besonders interessant gewordenen Zellen ermöglichen.

Auch die Auftrennung von Zellhomogenaten in einheitliche Fraktionen - sowohl an tierischem als auch an pflanzlichem Material - soll fortgesetzt werden. Zuordnungen komplexer Fermentreaktionen auf räumlich streng begrenzte Strukturen sind exakt nur an homogenem Untersuchungsmaterial möglich. Die neue Technik gestattet es, die Zusammensetzung der verschiedenen Organellen zu analysieren, ihre Enzyme zu isolieren und zu identifizieren und so einen großen Teil ihrer Funktionen besser kennen zu lernen.

Z u s a m m e n f a s s u n g

1. Es wird eine Methode der kontinuierlichen trägerfreien Elektrophorese in einem laminar und annähernd horizontal strömenden Flüssigkeitsfilm beschrieben, die durch eine einfache Lösung eine völlige Stabilisierung der Strömungsverhältnisse gewährleistet und genaue und streng reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten erlaubt.
2. Durch diesen Fortschritt konnte nicht nur die Trennschärfe gegenüber der Trägeranordnung wesentlich verbessert, sondern auch der Anwendungsbereich der Methode auf Linearproteine und auf Moleküle von extrem hohem Teilchengewicht (Viren, Phagen usw.) ausgedehnt werden.
3. Mit Hilfe dieser Methode gelang es unter anderem Wildformen von Phagen und deren Mutanten quantitativ zu trennen.
4. Die Trennung von Zellen und Zellorganellen gelang einwandfrei erst in einer vertikalen Anordnung der trägerfreien kontinuierlichen Elektrophorese. Die für diese Anordnung notwendige Leistungsfähigkeit des Kühlsystems konnte durch Anwendung des Prinzips der Peltier-Kühlung vollkommen erreicht werden.
5. In der vertikalen Trennanordnung wurden folgende Trennungen ausgeführt:
 - a) Auftrennung der Zellbestandteile aus grünem Spinat.
Es gelang die Isolierung der Chloroplasten, der Mitochondrien sowie der Kerne und Kernfragmente.
 - b) Bei der Auftrennung eines Rattenleberhomogenats konnten außer Mitochondrien und Mikrosomen auch Teile

des intrazeilulären Membransystems isoliert werden.

c) Trennung von Blutzellen.

Es gelang die Trennung einer künstlichen Mischung aus Kaninchen- und Humanerythrozyten, die Trennung von Leukozyten und Erythrozyten, sowie weitgehend die Auftrennung von Leukozyten in Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten.

d) Die nahezu quantitative Isolierung von Tumorzellen des Walker-Ascites-Tumors der Ratte unter voller Erhaltung der Vitalität.

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

- 1) A. Tiselius, Diss. Uppsala 1930; A. Tiselius, Trans. Faraday Soc. 33, 524 (1937); Biochem. J. 31, 313 (1937); Koll. Z. 85, 129 (1938).
- 2) P. König, 13. Congr. Sud. americ. Chim. Rio de Janeiro e Sao Paulo 1937, Bd. 2, S. 334; D.v. Klobusitzky u. P. König, A.e.P.P. 192, 271 (1939); G. Berraz, Anales asoc. quim. Argentina 31, 96 (1943).
- 3) Th. Wieland, Angew. Chem. 60, 313 (1948); Th. Wieland u. E. Fischer, Naturwiss. 35, 29 (1948); F. Turba u. H. Erenkel, Naturwiss. 37, 93 (1950).
- 4) W. Graßmann u. K. Hannig, Naturwiss. 37, 496 (1950); W. Graßmann, K. Hannig u. M. Knedel, Deut. med. Wschr. 76, 333 (1951); W. Graßmann u. K. Hannig, Z. physiol. Chem. 290, 1 (1952); Klin. Wschr. 32, 838 (1954).
- 5) a) Vortrag W. Graßmann (nach Versuchen mit K. Hannig), Tagung der physiol. Chemiker in Göttingen, 31. August 1949; Ref. Angew. Chem. 62, 170 (1950); Ber. Physiol. 139, 220 (1950).
b) W. Graßmann u. K. Hannig, Naturwiss. 37, 397 (1950); Z. Physiol. Chem. 292, 32 (1953).
c) K. Hannig, Clin. chim. Acta 3, 10 (1958); Z. physiol. Chem. 311, 63 (1958).
- 6) W.B. Hardy, J. Physiol. 24, 288 (1899).
- 7) P. Debye u. E. Hückel, Physik. Z. 24, 49 (1924).
- 8) G.H. Lewis and M. Randall, Am. Soc. 48, 1112 (1921).
- 9) E. Wiedemann, "Elektrophorese" in Hoppe-Seyler/Thierfelder, Handbuch der physiol. u. pathol. chem. Analyse, 10. Aufl. Band I, Berlin, Göttingen, Heidelberg 1935 S. 54.
- 10) G. Gouy, J. Physiol., London 9, 457 (1910).
- 11) A. Mahlig, "Freie Elektrophorese" in H.M. Rauen, Biochemisches Taschenbuch, 2. Aufl., Berlin, Göttingen, Heidelberg 1964.
- 12) H.A. Abramson, L.S. Moyer and M.H. Gorin, "Electrophoresis of Proteins", New York 1942.
- 13) H.G. Kunkel and A. Tiselius, J. gen. Physiol. 35, 89 (1951).

- 14) L. Baumgartner, Dipl. Arbeit, München 1956; K. Hannig, "Paniererelektrophorese in der Eiweißchemie" in Hoppe-Seyler/Thierfelder 10. Aufl. Band IV. S. 136, Berlin, Göttingen, Heidelberg 1960.
- 15) R. Weber, Helv. 36, 424 (1953).
- 16) H. Svensson, Ark. Kemi 22, 1 (1946); L.G. Longsworth and D.A. McInnes, Chem. Reviews 24, 271 (1939); L.G. Longsworth, Chem. Reviews 30, 323 (1942); E. Wiedemann, Helv. 31, 2037 (1948).
- 17) M. Macheboeuf, C.r.Soc.Biol. 135, 1241 (1941); H.J. Antweiler, Kolloid Z. 115, 130 (1949); 117, 110 (1950).
- 18) W. Nernst, Z. El. Chem. 3, 308 (1897).
- 19) A. Toepler, Ann. Phys. 127, 556 (1866); 128, 126 (1866); 131, 33, 180 (1867); 134, 194 (1868).
- 20) E. Wiedemann, Helv. 31, 2037 (1948).
- 21) H. Svensson and E. Valmet, Science Tools 2, 1 (1955).
- 22) H. Michl, Monatsh. f. Chem. 82, 489 (1951).
- 23) G. Werner u. O. Westphal, Angew. Chem. 67, 251 (1955).
- 24) H.E. Schultze u. H. Biel, Behring-Werk-Mitteil. 30, 72 (1955).
- 25) T.H. Wieland u. G. Pfeleiderer, Angew. Chem. 67, 257 (1955).
- 26) O. Smithis, Biochem. J. 61, 629 (1955); 71, 585 (1959); 73, 121 (1959); E. Wintersberger u. E. Rupp, Monatsh. Chem. 91, 406 (1960).
- 27) K.U. Giri, J. Indian Inst. Sci. 38, 190 (1956); R. Wieme, Behring-Werk-Mitteil. 31, 27 (1957); H. Van der Helm, Clin. chim. Acta 7, 124 (1962).
- 28) S. Raymond u. L. Weintraub, Science 130, 711 (1959); H. Ott, Med. Welt 1960, 2697.
- 29) R. Consden, A.H. Gordon and A.J.P. Martin, Biochem. J. 40, 33 (1946); H.G. Kunkel and R.J. Slater, Pr. Soc. exp. Biol. Med. 80, 42 (1952); W. Bockemüller u. R. Rebling, Chem.-Ing.-Techn. 24, 617 (1952); P. Volin and J. Porath, Biochim. biophysica Acta 13, 175 (1954); J. Porath, Acta chem. scand. 8, 1515 (1954); Biochim. biophysica Acta 22, 151 (1956).
- 30) J. Porath, Ark. Kemi 11, 161 (1957).

- 31) H. Svensson and J. Brattsten, Ark. Kemi 1, 401 (1949).
- 32) E.L. Durrum, Am.Soc. 73, 4875 (1951); H.H. Strain and J.C. Sullivan, Anal. Chem. 23, 816 (1951).
- 33) J. Brattsten and A. Nilsson, Ark. Kemi 3, 337 (1951).
- 34) K. Hannig, Z. anal. Chem. 181, 244 (1961).
- 35) J. Barrollier, E. Watzke u. H. Gibian, Z. Naturforsch. 13b, 754 (1958).
- 36) K. Wieck, Diss. Med. Fakultät der Freien Universität Berlin 1962; J. Chromatog. 13, 111 (1964).
- 37) R. Dobry and R. Finn, Science (Lancaster, Pa.) 127, 697 (1958).
- 38) M. Bier, Science (Lancaster, Pa.) 125, 1084 (1957).
- 39) A. Kolin, Proc. nat. Acad. Sci. USA 46, 509 (1960).
- 40) Vergl. z.B. : W.Pohlmann, Taschenbuch für Kältetechnik, Karlsruhe 1961.
- 41) Ch. Gerthsen, "Physik", Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg 1958, S. 76.
- 42) W. Jost, Diffusion, Methoden der Messung und Auswertung, Verlag: Dr. Dietrich Steinkopff, Darmstadt, 1957.
- 43) a) Handbook of Chemistry and Physics, Verlag: The Chemical Rubber Publishing Co., Cleveland, Ohio, 1963.
b) D.M. Greenberg, Amino Acids and Proteins, Charles C. Thomas Publisher, Springfield, S. 394 ff. (1951).
- 44) J. Brückner, J. physiol. Chem. 277, 181 (1943); Biochem. J. 60, 200 (1955).
- 45) H. Hörmann u. T. Fuji, Z. physiol. Chem. 328, 65 (1962).
- 46) U.J. Lewis, D.E. Williams and N.G. Brink, J. biol. Chem. 234, 2304 (1959).
- 47) W. Graßmann, L. Strauch u. A. Nordwig, Z. physiol. Chem. 332, 325 (1963).
- 48) O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall, J. biol. Chem. 193, 265 (1951).
- 49) M.L. Anson, J. gen. Physiol. 22, 79 (1938).
- 50) G. Hobom, G. Braunitzer u. K. Hannig, Z. physiol. Chem. (in Vorbereitung).

- 51) a) R.L.M. Syngé, in Vorbereitung; L. Fritsche, Diss. Univ. München 1964.
b) H. Bennhold u. L. Fröhlich, in Vorbereitung; H.J. Raap and T. Borsos, in Vorbereitung.
c) E. Haag, in Vorbereitung.
d) K. Hannig u. J. Comsa, C.R. Acad. Sc. 256, 1855 (1963); H.J. Raap, in Vorbereitung.
e) H. Appert, in Vorbereitung.
f) J. Markert, in Vorbereitung.
g) W. Jaffe u. K. Hannig, Biochim, biophys. Acta, im Druck.
- 52) F. Rueff, "Die Zellelektrophorese in der klinischen Diagnostik", Verlag J.F. Lehmann, München 1964.
- 53) R. Höber, Pflügers Arch. 101, 607 (1904); 102, 196 (1904).
- 54) H.A. Abramson, J. Gen. Physiol., 12, 469, 711 (1929).
- 55) H.A. Abramson and L.S. Moyer, J. Gen. Physiol., 14, 163 (1930).
- 56) L.R. Przyrembel, Diss. Univ. Breslau 1933.
- 57) H.A. Abramson, L.S. Moyer and M.H. Gorin, Electrophoresis of proteins and the chemistry of cell surfaces, Reinhold Publ. Corp., New York 1942.
- 58) G. Ruhenstroth-Bauer u. P. Sachtleben, Med. Grundlagenforschung, herausgegeben v. K. Fr. Bauer, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1959.
- 59) M.R. Thompson, Transact. Electrochem. Soc. 81, 147 (1942).
- 60) W. Piper, Diss. Universität Tübingen 1952.
- 61) K.G. Stern, Phys. techniques in biol. Res. 2, 243 (1956).
- 62) G. Ruhenstroth-Bauer u. W. Piper, Klin. Wochschr. 39, 9 (1961), P. Sachtleben, G.F. Fuhrmann, E. Straub u. G. Ruhenstroth-Bauer 39, 839 (1961).
- 63) K. Lang u. G. Siebert, Aufarbeitung von Zellen und Geweben. Hoppe-Seyler/Thierfelder, 10. Auflage, Bd. 2, S. 537-594, Berlin, Göttingen, Heidelberg 1955.
- 64) K. Paech u. M.V. Tracey, Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, Bd. 1, S. 12, Berlin, Göttingen, Heidelberg 1956; H.F. Linskens u. M.V. Tracey, Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, Bd. 6, S. 356, Berlin, Göttingen, Heidelberg 1963.

- 65) G.H. Hogeboom, W.C. Schneider and G.E. Palade, J. biol. Chem. 172, 619 (1948); W.C. Schneider, J. biol. Chem. 176, 259 (1948); J. Chauveau et G. Clement, Arch. Sci. physiol. 5, 277 (1951); J.M. Price, E.C. Miller, J.A. Miller and G.M. Weber, Cancer Res. 10, 18 (1950); C. de Duve, B.C. Pressman, R. Gianetto, R. Wattiaux and F. Appelmans, Biochem. J. 60, 604 (1955); C. de Duve, Structure and Function of Lysosomes. In : Funktionelle und morphologische Organisation der Zelle, S. 209 - 215, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1963.
- 66) E.G. Pickels, in A. Corcoran: Methods in Medical Research, Bd. 5, S. 107, Chicago 1952; H. Holter, M. Ottesen and R. Weber, Exper. 9, 346 (1953); C. de Duve and J. Berthet, Nature 172, 1142 (1953); T.E. Weier and C.R. Stocking, Am. J. Bot. 39, 720 (1952); A. Millerd, Proc. Linnean Soc. N.S. Wales 76, 123 (1951).
- 67) W. Piper u. G. Ruhenstroth-Bauer, Klin. Wschr. 34, 11 (1956).
- 68) Dan H. Moore and M.J. Lyons, J. National Cancer Inst. 31, 1255 (1963).
- 69) R. Furchgott and E. Ponder, J. gen. Physiol., Baltimore 24, 447 (1941).
- 70) E. Fritze, Pflügers Arch. Physiol. 257, 12 (1953).
- 71) S. Bazin et R. Robineaux, Compt. rend. Soc. biol., Paris 148, I, 455 (1954).
- 72) S. Bazin et. R. Robineaux, Compt. rend. Soc. biol., Paris 144, 959 (1950).
- 73) V.R. Potter and C.A. Elvehjem, J. biol. Chem. 114, 495 (1936).
- 74) S. Brenner and R.W. Horne, Biochim. biophys. Acta 34, 103 (1959).
- 75) F.S. Sjöstrand, Int. Rev. Cytol. 5, 456 (1956); F. Miller, Verh. dtsh. Ges. Path. 42, 261 (1958); F. Miller u. G.E. Palade, Verh. dtsh. Ges. Path. 47, 346 (1963).
- 76) A. Pappenheim, Anat. An. 42, 525 (1922).
- 77) W.J. Archibald, J. phys. Colloid Chem. 51, 1204 (1947).
- 78) R. Trautman, J. phys. 60, 1211 (1956); R. Trautman and Ch.F. Crampton, Am. Soc. 81, 4036 (1959).

Lebenslauf

Ich wurde am 26. Mai 1920 als einziges Kind des Kaufmannes Josef Hannig und seiner Ehefrau Ida, geborene Peuker, in Reichenberg, CSSR (Sudetenland), geboren. Nach dem Besuch der dortigen fünfklassigen Volksschule absolvierte ich vier Jahrgänge des Realgymnasiums und trat dann in die vierklassige Höhere Staatsgewerbeschule Reichenberg ein, in welcher ich am 27. Juni 1939 mein Abitur "Mit Auszeichnung" bestand.

Ab Wintersemester 1939 begann ich mein Studium an der Technischen Hochschule Berlin-Charlottenburg in der Fachrichtung Chemie und legte dort am 5. Dezember 1940 mein Diplomchemiker-Vorexamen ab. Anschließend setzte ich mein Studium an der Technischen Hochschule Dresden fort, bis ich im Mai 1941 zum Militärdienst einberufen wurde. Während eines elfmonatigen Studienurlaubes im Jahre 1943/44 konnte ich an der T.H. Dresden unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. W. Langenbeck mit der Diplomarbeit über "Neue Amine aus α , β -ungesättigten aliphatischen Aldehyden und sekundären Basen" und der Diplomchemiker-Hauptprüfung am 7. August 1944 mit dem Gesamturteil "Gut bestanden" mein Studium abschließen. Hierauf wurde ich wieder zur Wehrmacht einberufen und geriet am 7. April 1945 in französische Gefangenschaft, aus der ich erst am 10. April 1945 nach Bayern entlassen wurde.

Im Mai 1945 habe ich bei Herrn Prof. Dr. W. Graßmann die Stelle eines Assistenten angetreten, war zuerst als Vorlesungsassistent an der erweiterten Hochschule Regensburg tätig und wurde nach Errichtung der Forschungsstelle für Eiweiß- und Leder in der Max-Planck-Gesellschaft in Regensburg (Direktor: Prof. Dr. W. Graßmann) wissenschaftlicher Assistent (April 1949).

Seit 4. Juni 1949 bin ich verheiratet mit Traute, geb. Lauterbach. Am 16. Juni 1952 wurde uns ein Sohn Christian geboren.

Seit Anfang 1949 war mein Arbeitsgebiet neben allgemein eiweißchemischen Themen, insbesondere Kollagen, in der Hauptsache die Entwicklung und Anwendung neuer elektrophoretischer Analysen- und Trennmethoden. In dieser Zeit entstand meine Doktorarbeit über "Neue elektrophoretische Analysen- und Trennmethoden" unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Wolfgang Graßmann. Die Dissertation wurde an der Technischen Hochschule in Darmstadt angenommen, wo ich am 20. Mai 1953 das Doktor-examen mit dem Prädikat "Mit Auszeichnung bestanden" ablegte.

Nach der Übersiedlung des Max-Planck-Institutes für Eiweiß- und Lederforschung nach München im Jahre 1956 wurde ich Abteilungsleiter.

